

FABIANE OCHAI RAMOS

REDUÇÃO NO NÍVEL DE ANSIEDADE, AUMENTO DA ATIVIDADE LOCOMOTORA
E DÉFICIT NA MEMÓRIA DE TRABALHO DE RATOS COM EPILEPSIA DO LOBO
TEMPORAL

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de São Paulo para obtenção
do título de Mestre em Ciências

São Paulo
2014

FABIANE OCHAI RAMOS

REDUÇÃO NO NÍVEL DE ANSIEDADE, AUMENTO DA ATIVIDADE LOCOMOTORA
E DÉFICIT NA MEMÓRIA DE TRABALHO DE RATOS COM EPILEPSIA DO LOBO
TEMPORAL.

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de São Paulo para obtenção
do título de Mestre em Ciências

Orientador: Fulvio Alexandre Scorza
Co-orientador(a): Roberta Monterazzo
Cysneiros

São Paulo
2014

Ramos, Fabiane Ochai

Redução no nível de ansiedade, aumento da atividade locomotora e déficit na memória de trabalho de ratos com epilepsia do lobo temporal / Fabiane Ochai Ramos. – São Paulo, 2014.

62f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de pós-graduação em Neurologia/Neurociências.

Título em Inglês: Reduction in anxiety levels, increased locomotor activity and deficits in working memory in rats with temporal lobe epilepsy.

1. Epilepsia do Lobo Temporal. 2. Transtorno de Atenção e Hiperatividade. 3. Ansiedade. 4. Memória de Trabalho. 5. Atividade Locomotora.

FABIANE OCHAI RAMOS

**REDUÇÃO NO NÍVEL DE ANSIEDADE, AUMENTO DA ATIVIDADE LOCOMOTORA E DÉFICIT
NA MEMÓRIA DE TRABALHO DE RATOS COM EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL**

Presidente da Banca

Profº Dr. Fulvio Alexandre Scorza

Banca Examinadora

Profª. Draª. Alessandra Gotuzo Seabra

Profª. Drª. Monica Levy Andersen

Drª Eliza Yumi de Freitas Sonoda

Suplente

Drª Tathiana Aparecida Fernandes de Alvarenga

Esta dissertação foi realizada na Disciplina de Neurologia Experimental do Departamento de Neurologia e Neurocirurgia da Universidade Federal de São Paulo, durante o curso de pós-graduação em Neurologia/Neurociências. Auxílio financeiro: CNPq.

Dedico ao meu Anjinho, Nikita.

AGRADECIMENTOS

Não haveria pesquisa por minha parte se Deus não estivesse sempre ao meu lado nos momentos em que precisei. Cuidadosamente pedi para que Ele olhasse, cuidasse e posteriormente acolhesse todos os animais envolvidos nessa pesquisa. Se eu não tivesse a certeza da presença Dele e de que Ele estava atendendo aos meus pedidos, não teria finalizado meu trabalho. Por esse motivo, meu principal agradecimento é para Deus. E em seguida, como é de se esperar, agradeço a cada rato que, sem o poder da escolha, fez parte da minha pesquisa. Tenho certeza do lugar a onde eles se encontram hoje e é só por isso que me permiti utilizá-los. Obrigada.

Ao professor Dr. Fulvio Scorza, pela oportunidade, confiança e apoio.

À professora Dra. Roberta Cysneiros, primeiramente pela indispensável orientação, sem a qual não haveria início meio ou fim do meu trabalho. Da atenção valiosa ao meu projeto, além também da confiança depositada em mim. Meus sinceros agradecimentos e admiração.

Gostaria imensamente de dizer obrigada aos professores que estiveram presentes quando precisei de seu saber científico. Dentre eles, destaco Miriam Ribeiro, Esther Ricci e Maria Lucila.

Devo agradecer aos meus colegas de laboratório do Mackenzie, uns mais e outros menos, porém sem a ajuda de cada um, com certeza essa jornada teria sido mais exaustiva. Obrigada Luciana Pimentel, Adelisandra Castelhana, Renata Nassif, Cícera Pimentel e Bruna Pascarelli e, em especial, Natália Barom, Ana Maria, Júnior Rodrigues e Felipe Pinto.

Meus agradecimentos também aos colegas da Unifesp, tanto pela amizade quanto pela ajuda propriamente dita. Primeiramente a Manaíra Tobias e Luís Sierra, amigos que fiz e que pretendo levar comigo para onde eu for. E também, não menos importante, a Eliza Sonoda, Mariana Nejm e Márcia Marques. Obrigada!

Agradeço imensamente a minha família que me acompanhou nessa trajetória e principalmente ao apoio e aos conselhos oferecidos pela minha mãe em muitas ocasiões.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Fotografia 1:	Foto do Campo Aberto.....	27
Fotografia 2:	Foto do Labirinto em Cruz Elevado (Insight LTDA, Brasil).....	28
Fotografia 3:	Caixa de Condicionamento Operante.....	29
Fotografia 4:	Caixa de Isolamento Acústico.....	30
Figura 5:	Locomoção periférica expressa como média \pm erro padrão dos grupos CTR (n=11) e EXP (n=6). A locomoção periférica foi significativamente maior no grupo EXP comparativamente ao grupo CTR.....	34
Figura 6:	Locomoção central expressa como média \pm erro padrão dos grupos CTR (n=11) e EXP (n=6). A locomoção central foi significativamente maior no grupo EXP comparativamente ao grupo CTR.....	35
Figura 7:	Locomoção total expressa como média \pm erro padrão dos grupos CTR (n=11) e EXP (n=6). A locomoção total foi significativamente maior no grupo EXP comparativamente ao grupo CTR.....	35
Figura 8:	Número de Eventos de Levantar expresso como média \pm erro padrão dos grupos CTR (n=11) e EXP (n=6). O comportamento exploratório não diferiu entre os grupos.....	36
Figura 9:	Tempo na zona central (A), tempo na zona periférica (B) e razão da zona central pela periférica (C) expressos com média \pm erro padrão dos grupos CTR (n=11) e EXP (n=6). Os animais experimentais exibiram maior tempo de permanência na zona central e menor tempo na zona periférica comparativamente aos animais controles.....	37
Figura 10:	Total de entradas (TENT) expresso como média \pm erro padrão dos grupos CTR (n=11) e EXP (n=6). O grupo experimental apresentou maior atividade locomotora comparativamente ao grupo experimental.....	38
Figura 11:	Porcentagem de entradas nos braços abertos (EBA %) expresso como média \pm erro padrão dos grupos CTR (n=11) e EXP (n=6). Não foram observadas diferenças significantes entre os grupos, sessões ou interação entre os fatores.....	38
Figura 12:	Porcentagem de tempo nos braços abertos expresso como média \pm erro padrão dos grupos CTR (n=11) e EXP (n=6). Não foram observadas diferenças significantes entre os grupos, sessões ou interação entre os fatores.....	38

Figura 13:	Percentagem de acerto expresso como média \pm erro padrão dos grupos CTR (n=11) e EXP (n=6). Não foram observadas diferenças significantes entre os grupos, mas sim das sessões e houve interação entre os fatores.....	40
Figura 14:	Total de Pressões às barras expresso como média \pm erro padrão dos grupos CTR (n=11) e EXP (n=6). Não foram observadas diferenças significantes entre os grupos, mas sim das sessões e houve interação entre os fatores.....	40
Figura 15:	Percentagem de acerto expresso como média \pm erro padrão dos grupos CTR (n=11) e EXP (n=6). Não foram encontradas diferenças significantes entre os grupos, mas sim das sessões. Não houve interação entre os fatores.....	41
Figura 16:	Total de Pressões às barras expresso como média \pm erro padrão dos grupos CTR (n=11) e EXP (n=6). Os grupos não diferiram estatisticamente. Houve diferença entre as sessões e efeito da interação entre os fatores.....	42
Figura 17:	Percentagem de acertos (A) e número de pressões às barras (B) expressos como média \pm erro padrão dos grupos CTR (n=11) e EXP (n=6). Com a redução do tempo de exposição dos pontos luminosos, ambos os grupos apresentaram redução na percentagem de acertos e aumento no número de pressões à barra.....	42
Figura 18:	Percentagem de acertos expressos como média \pm erro padrão dos grupos CTR (n=11) e EXP (n=6). A percentagem de acertos estabilizou em um patamar inferior no grupo experimental comparativamente ao grupo controle.....	43
Figura 19:	Número de pressões à barra expresso como média \pm erro padrão dos grupos CTR (n=11) e EXP (n=6). O total de pressões à barra reduziu gradualmente em ambos os grupos no decorrer das sessões, estabilizando em um patamar superior no grupo experimental.....	44
Figura 20:	Percentagem de acertos (A) e número de pressões às barras (B) expressos como média \pm erro padrão dos grupos CTR (n=11) e EXP (n=6) nos três protocolos da caixa de condicionamento operante.....	45

LISTA DE SIGLAS

AC:	Acido Caínico
CaMKII:	Proteína Cinase II Dependente de Cálcio Calmodulina
CTR:	Controle
CCO:	Caixa de Condicionamento Operante
DA:	Dopamina
DAT:	Transportador de DA
EBA %:	Porcentagem de entradas nos braços abertos
ELF:	Epilepsia do Lobo Frontal
ELT:	Epilepsia do Lobo Temporal
ELTM:	Epilepsia do Lobo Temporal Mesial
EXP:	Experimental
FIG:	Figura
GABA:	Ácido Aminobutírico
GFAP:	Proteína Acídica Fibrilar Glial
GLU:	Glutamato
HPA:	Hipotálamo – Hipófise – Adrenal
LCE:	Labirinto em Cruz Elevado
LIP:	Lítio - Pilocarpina
LTM:	Lobo Temporal Medial
M1:	Córtex Motor Primário

MT:	Memória de Trabalho
NE:	Norepinefrina
SE:	<i>Status Epilepticus</i>
SHR:	Rato Espontaneamente Hipertenso
TBA %:	Porcentagem de tempo nos braços abertos
TDAH:	Déficit de Atenção e Hiperatividade
TENT:	Total de entradas

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	15
1.1.	Epilepsia	15
1.2.	Epilepsia do Lobo Temporal	15
1.3.	Estudos em Modelos Animais	16
1.4.	Indução à ELT por Pilocarpina	17
1.5.	Epilepsia e Funções Cognitivas	17
1.6.	Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH)	20
1.7.	TDAH e EPILEPSIA	22
2.0.	OBJETIVOS	24
2.1.	Objetivo Geral	24
2.2.	Objetivos Específicos	24
3.0.	Materiais e Métodos	25
3.1.	Animais	25
3.1.2.	Grupos	25
3.2.	Modelo de Epilepsia	25
3.3.	Testes Comportamentais	26
3.3.1.	Campo Aberto e Labirinto em Cruz Elevado (LCE)	26
3.3.1.2	Campo Aberto	26
3.3.1.1.	LCE	27
3.3.2.	Caixa de Condicionamento Operante	28
3.3.3.1.	Aparato	29
3.3.3.2.	Modelagem	30
3.3.3.2.1.	Protocolo experimental 1	31
3.3.3.2.2.	Protocolo experimental 2	31
3.3.3.2.3.	Protocolo experimental 3.....	32
3.3.3.	Mensurações	32

3.4.	Análise Estatística	32
4.	RESULTADOS	34
4.1.	Campo Aberto.....	34
4.2.	LCE	37
4.3.	Caixa de Condicionamento Operante	39
4.3.1.	Protocolo 1	39
4.3.2	Protocolo 2	41
4.3.3	Protocolo 3	42
4.4.	Frequência das Crises	45
5.	Discussão	47
6.	CONCLUSÃO	54
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
	ANEXOS	62

RESUMO

A epilepsia é caracterizada por crises espontâneas recorrentes, desencadeadas pela hiperexcitabilidade neuronal, acometendo aproximadamente 50 milhões de pessoas no mundo. Dentre as epilepsias, a epilepsia do lobo temporal (ELT) é a mais comum e afeta cerca de 40% dos pacientes. O Transtorno do Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH) representa uma das comorbidades mais comum da epilepsia com prevalência maior do que 30%. A DSM-IV subdivide o TDAH em três tipos, no primeiro tipo se observa o predomínio de sintomas de desatenção; o segundo há predominância de hiperatividade/impulsividade e; o terceiro se caracteriza pela combinação dos dois primeiros tipos. Embora exista uma relação bem definida entre epilepsia e TDAH, os mecanismos dessa comorbidade ainda não foram completamente esclarecidos. O objetivo do presente estudo foi analisar alterações comportamentais TDAH-like em ratos *Wistar* machos com ELT induzida pelo método da pilocarpina. Foram utilizados os testes de campo aberto, labirinto em cruz elevado e caixa de condicionamento operante para avaliação dos comportamentos. Os resultados apresentados mostram evidências que animais adultos com ELT pelo modelo da pilocarpina apresentaram aumento da atividade locomotora e redução do nível de ansiedade, prejuízo na memória de trabalho viso-espacial, sem evidências de impulsividade. Os resultados não permitem descartar a possibilidade de déficit de atenção e apontam para a presença de hiperatividade, sintomas característicos de TDAH, porém mais estudos serão necessários para avaliar a atenção e a impulsividade.

Palavras-chave: Epilepsia do Lobo Temporal, Déficit de Atenção e Hiperatividade, Ansiedade, Memória de Trabalho, Atividade Locomotora.

ABSTRACT

Epilepsy is characterized by recurrent spontaneous seizures triggered by neuronal hyperexcitability, affecting approximately 50 million people worldwide. Among the epilepsy, temporal lobe epilepsy (TLE) is the most common and affects about 40% of patients. Disorder Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD) is one of the most common comorbidities of epilepsy with greater than 30% prevalence. The DSM - IV subdivided the ADHD into three types, the first type is observed the predominance of symptoms of inattention; the second, predominance of hyperactivity / impulsivity and; the third is characterized by the combination of the first two types. Although there is a well defined relationship between epilepsy and ADHD, the mechanisms of this comorbidity were poorly understood. The aim of this study was to assess ADHD-like behavioral changes in male Wistar rats with TLE induced by pilocarpine method. Tests of open field, elevated plus maze and operant conditioning box were used to assess the behaviors. The results show evidence that adult animals with TLE by pilocarpine model presented increased locomotor activity and reduced level of anxiety like behavior, impairment in visuospatial working memory, with no evidence of impulsivity. The results don't dismiss the possibility of attention deficit and point to the presence of hyperactivity, characteristic symptoms of ADHD, but more studies are necessary to evaluate the attention and impulsivity.

Keywords: Temporal Lobe Epilepsy, Attention Deficit Hyperactivity Disorder, Anxiety, Working Memory, Locomotor Activity.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Epilepsia

O termo “epilepsia” é oriundo da palavra grega *epilambanein*, cujo significado é “aprender, possuir ou afligir”. O primeiro relato dessa condição surgiu no ano de 2000 a.C. A primeira descrição formal dessa condição foi feita por Hipócrates em seu tratado “*On the Sacred Disease*”, onde ele dizia que a epilepsia, assim como as outras doenças, era de natureza divina (MAGIORKINIS, 2010).

A epilepsia é caracterizada por crises espontâneas recorrentes, desencadeadas pela hiperexcitabilidade neuronal, decorrente de um desequilíbrio entre a transmissão neuronal inibitória e excitatória (ácido aminobutírico – GABA e Glutamato – GLU, respectivamente) (DALBY; MODY, 2001; DICHTER et al., 1994).

Os fatores de risco para a epilepsia são doença cerebrovascular, tumor cerebral, ingestão de álcool, traumatismo craniano, má formação cortical, herança genética e infecção do sistema nervoso central (por malária e neurocisticercose) (SCORZA et al., 2009; BRUNO et al., 2013). Esta condição neurológica acomete aproximadamente 50 milhões de pessoas no mundo. Nos Estados Unidos cerca de 100 mil novos casos de epilepsia são diagnosticados (KWAN; SANDER 2004; SANDER 1993). Estudos epidemiológicos mostram que 20 a 30% das pessoas apresentam crises refratárias ao tratamento medicamentoso (DUNCAN, 2006; KWAN; SANDER 2004; SANDER 1993).

As crises epiléticas podem ser classificadas em dois tipos, generalizadas ou focais. De acordo com Duncan (2006), as crises focais indicam o envolvimento inicial de apenas um dos hemisférios cerebrais, enquanto as generalizadas atingem os dois hemisférios cerebrais simultaneamente.

1.2. Epilepsia do Lobo Temporal

Dentre as epilepsias focais e refratárias, a Epilepsia do Lobo Temporal (ELT) é a mais comum e afeta cerca de 40% dos pacientes (BABB, 1999). Nos países desenvolvidos a incidência de ELT tende a ser maior em crianças e idosos, já em países em desenvolvimento encontra-se maior incidência em adultos jovens (Téllez-Zenteno, 2012). Esse distúrbio geralmente está associado à atrofia das estruturas temporais mesiais e a esclerose hipocampal (CENDES, 2005).

Na esclerose hipocampal há morte neuronal nas regiões do hilo, CA1 e CA3 do hipocampo; gliose secundária; e atrofia hipocampal. Estudos demonstram que, em casos mais graves de ELT, ocorre perda neuronal em regiões extra-hipocampais, como amígdala, tálamo, cerebelo, giro para-hipocampal e córtex entorrinal (GUEDES et al., 2006).

A gliose decorrente da esclerose hipocampal é a proliferação e hipertrofia das células gliais, originando um aumento na expressão da proteína acídica fibrilar glial (GFAP). Estudos experimentais com animais mostram que há aumento na expressão da GFAP em outras regiões cerebrais como tálamo, amígdala e neocórtex. Essas alterações são heterogêneas e as diferenças podem estar relacionadas com a frequência das crises (GUEDES et al., 2006). Além da perda neural e gliose decorrentes da ELT, podem ocorrer diferentes alterações de origens desconhecidas, como a neurogênese, alterações dendríticas (tanto na morfologia, quanto na localização dos dendritos), reorganização axonal (brotamento de fibras musgosas) e aumento na expressão de sinapses elétricas (GUEDES et al., 2006).

1.3. Estudos em modelos animais

Os modelos animais experimentais geralmente utilizam ratos e camundongos e apresentam como principal vantagem o controle de variáveis, como a uniformidade genética, idade, monitoramento da frequência, início e intervalo interictal das crises (DALBY; MODY, 2001; RUBIO et al., 2010; GUEDES et al., 2006). Esses experimentos *in vivo* permitem estudar as características histopatológicas e comportamentais similares às encontradas na

ELT humana. Rubio et al. (2010), em seu artigo de revisão, descrevem os modelos que induzem epilepsia utilizados atualmente. Alguns exemplos deles são administração de ácido caínico, eletrochoque, aplicação de cobalto e injeção sistêmica de pilocarpina.

1.4. Indução a ELT por Pilocarpina

A pilocarpina é um agonista dos receptores muscarínicos. A administração sistêmica de pilocarpina (320 a 380mg/kg, intraperitoneal) em roedores desencadeia mudanças comportamentais e eletrográficas que podem ser divididas em três períodos distintos: agudo, silencioso e crônico. O período agudo é caracterizado pelo alcance progressivo ao *status epilepticus* (SE) e tem durabilidade de 24 horas. O período silencioso, é caracterizado por uma progressiva normalização comportamental e eletroencefálica com duração que varia de 4 a 44 dias. E o último, denominado período crônico, é caracterizado pela ocorrência de crises espontâneas e recorrentes que podem perdurar por toda a vida do animal (TURSKI et al., 1984; RUBIO et al., 2010; SCORZA et al., 2009; CAVALHEIRO et al., 1991). O modelo da pilocarpina foi escolhido para este trabalho uma vez que os achados neuropatológicos, eletrográfico e cognitivo são compatíveis com a epilepsia do lobo temporal na condição humana (SCORZA et al., 2009).

1.5. Epilepsia e Funções Cognitivas

As alterações estruturais e funcionais decorrentes da ELT podem atingir não somente o lobo temporal, como também o lobo frontal, o qual está associado a processos cognitivos, incluindo funções executivas, memória de trabalho (MT), tomada de decisão, planejamento, flexibilidade cognitiva e atenção sustentada. Essas funções cognitivas referem-se à capacidade de adaptação a situações não rotineiras, como a novidade, conflitos e tarefas complexas (ZAMARIAN, 2011). Entretanto, ainda há controversas se prejuízos nas funções cognitivas são devido à propagação da atividade epilética da zona epileptogênica para os

lobos frontais ou se o comprometimento dessa região é um resultado dos danos causados no lobo temporal que estão envolvidos nas funções cognitivas (STRETTON; THOMPSON, 2012).

Existem muitos estudos que relacionaram a epilepsia com prejuízos nas funções executivas. Takaya et al. (2006) analisaram a função cognitiva e o metabolismo de glicose do córtex pré-frontal em pacientes com epilepsia do lobo temporal mesial (ELTM) e demonstraram que pacientes com crises frequentes apresentaram hipofunção do córtex pré-frontal (hipometabolismo de glicose) associada a um pior desempenho em teste cognitivo. Observou-se também em pacientes com ELTM um pior desempenho em testes cognitivos de MT, flexibilidade cognitiva, fluência verbal categórica, categorização e planejamento (ZAMARIAN et. al., 2011), e apresentaram baixo desempenho em testes de aprendizagem e atenção (ALLEGRI et al., 1999). Keller et al. (2009) investigaram o volume do córtex pré-frontal dorsal de pacientes com ELT e o relacionaram ao desempenho em funções cognitivas. Os resultados mostraram que pacientes com ELT, quando comparados a pessoas saudáveis, apresentaram atrofia dessa região associada a pior desempenho em testes de funções executivas. Porém, existem controvérsias, pois McDonald et al. (2005) analisaram pacientes com epilepsia do lobo frontal (ELF) e pacientes com ELT, comparados a pessoas saudáveis, e concluíram que apenas o grupo ELF apresentou prejuízo significativo no teste de flexibilidade mental. Os pacientes com ELT apresentaram desempenhos semelhantes aos controles. Devido a controvérsias, mais estudos são necessários.

Para o ideal funcionamento da maioria das tarefas cognitivas são necessárias a MT e a memória de curto-prazo. Há uma diferença entre esses dois tipos de memória. A de curto-prazo refere-se a retenção de informações na mente por curto período de tempo (15 a 30 segundos); já a MT envolve a manipulação mental das informações retidas; seus comprometimentos podem causar prejuízos na rotina de vida diária (STRETTON et al., 2013, STRETTON; THOMPSON, 2012; BADDELEY, 1992).

Alguns estudos evidenciam disfunção na MT em pacientes com ELT. Duncan e Thompson (2005) e Abrahams (1999) observaram prejuízo na MT espacial em pacientes com ELT. Contudo resultados divergentes também são relatados na literatura. Cowen e Green (1996) mostraram que pacientes com ELT apresentaram desempenho na MT semelhante aos

controles sem epilepsia. A discrepância entre resultados aponta para a natureza progressiva da doença, e que variáveis como: início precoce, longa duração e alta frequência de crises podem resultar em maior grau de comprometimento cognitivo (DUNCAN; THOMPSON, 2005; BLACK et. al., 2010).

Atenção é um processo neuropsicológico complexo com função de facilitar a atividade mental consciente. Um indivíduo é capaz de processar uma informação específica a partir de grande quantidade de informações que chegam a seu cérebro, esse processo é chamado de atenção seletiva que é utilizada nos processos de aprendizagem (STELLA; MACIEL, 2003). A atenção está ancorada em muitas estruturas cerebrais; estudos de neuroimagem mostraram que existem pelo menos três redes neurais que funcionam separadamente e em conjunto para apoiar vários aspectos da atenção. Essas redes são (a) rede de vigilância que compreende o lobo frontal direito e o lobo parietal direito; (b) uma rede de atenção executiva que inclui áreas frontais laterais esquerdas e cíngulo anterior e; (c) uma rede de orientação que consiste os circuitos parietais, do mesencéfalo e do tálamo. Pacientes com ELT podem apresentar déficits na atenção, fortificando a hipótese de que a ELT pode prejudicar as funções cognitivas (HELMSTAEDTER et. al., 1996).

Além de alterações em funções executivas, é observado também alterações comportamentais, como aumento significativo da ansiedade (MÜLLER et al., 2009a; MÜLLER et al., 2009b; WENIGER et al., 2004) e diminuição de comportamentos sociais (MARIN et al., 2008), que podem estar relacionados com alterações neuroquímicas anatômicas decorrentes das crises.

De acordo com *National Institute of Mental Health* a ansiedade afeta aproximadamente 40 milhões de adultos americanos com 18 anos ou mais por ano. É definida como uma reação normal ao estresse; porém em algumas pessoas essa reação é exacerbada, afetando de modo negativo a rotina diária da pessoa. Esse transtorno ocorre geralmente junto com outras doenças mentais ou físicas, incluindo o abuso de álcool ou drogas. As estruturas cerebrais que estão envolvidas com esse distúrbio são a amígdala e o hipocampo. A ansiedade é comum em pacientes com epilepsia; de 49 pacientes com epilepsia que frequentam um centro de epilepsia terciário, 57% apresentam ansiedade de alto nível. O risco é aumentado em pessoas com epilepsia focal e dentre estas a ELT, com

aproximadamente 19% de prevalência (Trimble, et al., 1998). Goldstein et. al. (2000) descobriram em seus estudos que a alta frequência de crises relaciona-se com baixo nível de ansiedade e vice versa.

1.6. Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH).

De acordo com o *National Institute of Mental Healthy (U.S.)* o TDAH é um distúrbio que acomete crianças, podendo persistir pela adolescência e vida adulta, afetando negativamente a vida cotidiana acadêmica e social. Os sintomas desse transtorno incluem dificuldade em permanecer focado e prestando atenção, hiperatividade e impulsividade.

De acordo com a DSM-V o TDAH é caracterizado por um padrão de comportamento presente em diferentes ambientes que pode influenciar o desempenho em contextos de ambientes sociais, educacionais ou de trabalho. A DSM-IV subdivide os sintomas deste distúrbio em duas categorias, sendo elas desatenção e hiperatividade e; impulsividade. Esta última categoria pode incluir falta de atenção em detalhes, dificuldades em organizar tarefas e atividades, fala excessiva, inquietação ou incapacidade de permanecer sentado em algumas situações.

Ainda não há um consenso científico sobre a etiologia do TDAH, mas, na maioria dos casos, a origem é familiar. Diversas pesquisas reforçam a hipótese de que o TDAH tem um caráter hereditário significativo. Pais com o distúrbio apresentam 50% de chances de terem filhos com a mesma condição (VOELLER, 2004). Fatores ambientais também podem estar relacionados com o surgimento do TDAH, como o uso de álcool e consumo de cigarro na gravidez (NOMURA et al. 2010; MILLICHAP, 2008).

A prevalência desse distúrbio está entre 3% e 9% em crianças na idade escolar, sendo mais comum em meninos do que em meninas, 1,7:1, respectivamente (ANDERSON, 1987; ROHDE, 1999; SZATMARI, 1989). Fontana, et al. (2007) estudaram crianças de quatro escolas brasileiras e encontraram uma prevalência de TDAH mais elevada (13%), com proporção 2:1 (meninos : meninas). Em adultos, a prevalência de TDAH é de aproximadamente 4% (KESSLER, 2004; MURPHY; BARKLEY, 1996, FARAONE, 2005).

O TDAH é considerado um distúrbio da função dos neurotransmissores dopamina (DA) e norepinefrina (NE). Estudos demonstram que a DA é essencial na regulação da aprendizagem, MT, humor, tomada de decisão e recompensa, enquanto a NE está envolvida com a manutenção do estado de alerta, atenção, humor e o despertar (VOELLER, 2004). Esses neurotransmissores conectam as estruturas subcorticais ao córtex frontal, e uma desregulação nesse circuito pode levar ao TDAH.

Muitos estudos foram realizados, sustentando a hipótese de que o sistema catecolaminérgico, DA e NE, medeiam o início e a expressão do TDAH e que esse transtorno decorre da desregulação do córtex frontal, estruturas subcorticais e das redes que os conectam. Uma das linhas de pesquisa mostra que medicamentos anti-TDAH agem nas vias noradrenérgicas e dopaminérgicas (SOLANTO, 1998); outra linha de pesquisa mostra que ratos hipertensos (SHR – modelo de estudo para TDAH, descrito adiante) apresentam déficits catecolaminérgicos; estudos com camundongos knockouts para os receptores dopaminérgicos D2, D3 e D4 mostram que esses genes regulam a atividade locomotora; e pesquisas clínicas demonstram que os genes DRD4 e DAT (transportador de DA) estão envolvidos com o TDAH. Porém, os sistemas nicotínicos (MILBERGER et al., 1996; JOHNS et al., 1982) e serotoninérgicos também podem estar envolvidos com esse transtorno. O que sustenta essa ideia é o fato de que agonistas nicotínicos ajudam a controlar os sintomas do TDAH; a ativação nicotínica aumenta a neurotransmissão dopaminérgica e é observado que os efeitos paradoxais de estimulantes para a hiperatividade são mediados pela neurotransmissão serotoninérgica (PLISZKA et al., 1996; RUSSEL et al., 1995; RUSSEL 2000; GAINETDINOV et al., 1999; FUNG; LAU, 1989; FARONE; BIEDERMAN, 2005).

Outros dados mostram que pacientes com TDAH apresentam o córtex pré-frontal, núcleo caudado e globo pálido (regiões que apresentam alta densidade de receptores de DA) com tamanhos reduzidos ao se comparar com pessoas saudáveis, sugerindo uma falta de conectividade que modula a atenção e a impulsividade (CASTELLANOS et al., 2002; VALERA et al., 2007; SWANSON et al., 2004). Os estudos de neuroimagem funcional (fMRI), revelam que tarefas que ativam a rede fronto-estriatal-cerebelar quando analisadas em pacientes com TDAH apresentam-se hipoativadas. Corroborando com hipótese dopaminérgica no TDAH, os estudos revelam uma hipoativação da via cortico-estriatal-talâmica dopaminérgica (VAIDYA et al., 1998; RUBIA et al., 1999; DURSTON, et al., 2006; SWANSON et al., 2004).

O modelo animal atualmente mais amplamente utilizado para os estudos do TDAH é o rato espontaneamente hipertenso (SHR) (SAGVOLDEN et al., 1992). O modelo apresenta validade de face, de construto e preditiva (WILNNER, 1991). A validade de face refere-se à semelhança de comportamentos apresentados pelo modelo animal com os apresentados pelos humanos; neste caso, os SHR mostram-se hiperativos, impulsivos e desatentos, assim como pacientes com o TDAH (SAGVOLDEN et al., 2009). Na validade de construto, o modelo animal deve apresentar as bases fisiopatológicas ou a hipótese da desordem estudada (genética e neuroquímica); os déficits encontrados nos SHR tendem a estar relacionados com disfunção dentro do sistema fronto-estriatal, apresentando uma liberação diminuída de DA no córtex pré-frontal, núcleo acumbes e putâmen caudado (RUSSEL et al., 1995; RUSSEL, 2000) e baixa densidade de receptores D4 no córtex pré-frontal (LI et al., 2007). A validade preditiva é a capacidade de fornecer novo potencial de tratamento (na prática, seria o uso de drogas com efeitos semelhantes em humanos e no modelo animal). Animais SHR tratados com agentes monoaminérgicos têm seus sintomas reduzidos; animais knockouts para o gene DAT apresentam hiperatividade reduzida com psicoestimulantes (SONTAG et al., 2010; SAGVOLDEN et al., 2009; SAGVOLDEN et al., 2000; WILNNER, 1991).

1.7. TDAH e EPILEPSIA

O TDAH é mais frequente em crianças com epilepsia do que em crianças saudáveis, a prevalência estimada é de 30% a 40% (COHEN et al., 2013; DUNN et al., 2003; LOUTFI; CARVALHO, 2010; TAN e APPLETON, 2005).

Embora haja uma relação bem estabelecida entre os dois distúrbios, os mecanismos dessa comorbidade ainda não estão claros. Torna-se difícil o estudo clínico de pacientes com epilepsia-TDAH devido à natureza bidirecional existente, dificultando a separação entre causa e consequência (PINEDA et al., 2014). Evidências crescentes sugerem que o TDAH pode ser anterior ao início da epilepsia. Essa hipótese é sustentada pela ideia de que alguns sintomas do TDAH foram manifestados antes da primeira crise epilética. Dessa maneira, as

crises recorrentes espontâneas e as drogas antiepiléticas podem não representar um fator etiológico para a manifestação do transtorno (PARISI et al., 2010).

A pesquisa experimental analisando a relação entre ELT e TDAH é incipiente e somente um artigo foi recentemente publicado. Pineda, et al. (2014) observaram que metade dos ratos com ELT apresentaram diminuição da atenção na tarefa de Tempo de Reação Lateralizado e Impulsividade (redução do número de escolhas corretas – “*nose poke*”) sugerindo comportamento TDAH-like que foram relacionados com a supressão da transmissão noradrenérgica no *locus coeruleus*. A outra metade apresentou comportamento do tipo depressivo no teste de Natação Forçada (aumento do tempo de imobilidade), relacionado com a diminuição da transmissão serotoninérgica no núcleo da rafe.

Devido a pouca compreensão da relação entre epilepsia e TDAH, mais estudos precisam ser realizados. O uso de modelos animais dispõe de sistemas reprodutíveis que permitem serem examinados na ausência de anormalidades neurocomportamentais iatrogênicas.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

O presente trabalho teve por objetivo analisar alterações comportamentais TDAH-like em ratos machos com ELT induzida pela pilocarpina.

2.2. Objetivos Específicos

- Analisar a atividade locomotora, comportamento do tipo ansioso, atenção, impulsividade e frequência de crises.

3. Materiais e Métodos

Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade Presbiteriana Mackenzie (CEUA/UPM N° 093/08/2012, Anexo I). Todos os esforços foram realizados para minimizar o sofrimento e limitar o número de animais utilizados.

3.1. Animais

Para o presente estudo foram utilizados ratos machos *Wistar* provenientes do Biotério Central da Universidade Presbiteriana Mackenzie (CEUA/UPM) que ficaram alojados em gaiolas coletivas neste local até o 25º dia de vida. Após esse período, os animais foram mantidos em uma sala de vídeo-monitoração no Laboratório de Neurobiologia da UPM, em caixas coletivas. Tanto no biotério quanto na sala de vídeo-monitoração as condições eram controladas (ciclo claro/escuro 12h e temperatura 22 – 24°C). Os animais tiveram livre acesso a água e comida até o início dos testes comportamentais (60º dia de vida).

3.1.2. Grupos

Foram utilizados 17 animais, formando 2 grupos diferentes.

- Grupo Controle (CTR): 11 animais administrados com salina e diazepam;
- Grupo Crônico (CRO): 6 animais submetidos ao SE pela administração de pilocarpina que desenvolveram epilepsia.

3.2. Modelo de Epilepsia

Ratos *Wistar* machos com 25 dias de vida foram submetidos ao modelo de epilepsia induzido pela pilocarpina (TURSKI et al., 1983). Os animais foram administrados com metilescopolamina (1mg/kg, sc), com o objetivo de evitar efeitos periféricos provocados pela pilocarpina. Após 30 minutos os animais receberam injeção sistêmica via intraperitoneal de pilocarpina na concentração de 3,8% (380mg/kg). Ao fim de 3 horas após o SE, os animais receberam diazepam (7,5mg/kg). Os animais controles receberam salina 0,9% ao invés de pilocarpina e metilescopolamina e também foram administrados com diazepam.

Após a indução ao SE os animais foram levados para a sala de vídeo-monitoração. A filmagem ocorreu durante 24h por dia, a partir da indução do estado de mal epiléptico até a finalização dos experimentos (aproximadamente 4 meses).

3.3. Testes Comportamentais

Os testes comportamentais tiveram início ao 60º dia de vida dos animais. Na troca de um animal por outro, os aparatos foram limpos com álcool 5%, a fim de evitar possíveis rastros de odor deixados pelo animal anterior.

3.3.1. Campo Aberto e Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

Antes do início dos testes Campo Aberto e LCE os animais foram habituados à sala de comportamento por 60 minutos. Os testes ocorreram sob baixa iluminação de luz branca. Foram realizadas 3 exposições com intervalo de 7 dias.

Os testes de Campo Aberto e Labirinto em Cruz Elevado (LCE) foram filmados para auxiliar nas mensurações dos parâmetros observados.

3.3.1.1. Campo Aberto

O aparato consistiu de uma arena circular deacrílico branco com 60 cm de diâmetro x 50 cm de altura subdivido em 12 zonas, sendo 8 periféricas e 4 centrais (Insight Ltda, Brasil, Fig. 1). Os animais foram colocados na área central e observados por 10 minutos. Durante este período, foram mensurados a atividade locomotora central, periférica e total e o tempo de imobilidade. Cada unidade de locomoção correspondeu ao ato do animal entrar com as 4 patas em qualquer um dos quadrantes do campo aberto. O teste foi repetido 7 e 15 dias após a exposição inicial a fim de investigar a habituação.



Fig. 1. Foto do Campo Aberto

3.3.1.2. LCE

O teste apresenta ao animal o conflito entre sua tendência natural de explorar um novo ambiente e sua relutância em se expor em território aberto no qual o risco de quedas e predadores é maior. Como consequência, os menos ansiosos exploram mais o braço aberto. O LCE foi composto de 4 braços, sendo 2 abertos (10 x 50 cm) e 2 fechados (10 x 50 x 45 cm), arranjados de forma que os braços do mesmo tipo ficaram em oposição entre si, ligados por uma área central (10 x 10 cm). O aparelho foi elevado a 40 cm do chão (Insight Ltda, Brasil) (Fig. 2). Cada animal foi submetido a 3 sessões de cinco minutos cada, com intervalo de 7 dias. Os animais foram posicionados no centro da plataforma com a face voltada para o

braço aberto e foram mensurados o número de entradas e o tempo de permanência em cada um dos braços (aberto/fechado). Os parâmetros foram expressos como percentagem de entradas ou tempo nos braços abertos utilizando-se a seguinte fórmula: $[(\text{braços abertos} / \text{braços abertos} + \text{braços fechados}) \times 100]$.



Fig. 2. Foto do Labirinto em Cruz Elevado (Insight LTDA, Brasil).

3.3.2. Caixa de Condicionamento Operante

A utilização da caixa de condicionamento operante (CCO) teve como objetivo analisar a hiperatividade, atenção e impulsividade dos animais com ELT em uma tarefa de discriminação visual. Os animais foram avaliados em 3 experimentos, cada um com 15 sessões com duração de 30 minutos cada.

Era considerado que o animal acertava a tarefa quando pressionavam a barra enquanto as luzes acima dela estavam acesas e consideraram-se erros quando as pressões ocorriam enquanto as luzes estavam apagadas.

Antes de iniciarem os experimentos de discriminação visual, os animais passaram por uma fase de modelagem para adquirir o conhecimento de pressionarem as barras.

3.3.2.1. APARATO

As sessões experimentais foram conduzidas no *Habitest Coulbourn Instruments*. A arena da CCO é composta por duas alavancas com 3 luzes (amarela, verde e vermelha) acima delas. Uma alavanca à direita e uma à esquerda de um dispensador de água localizado no centro da arena. O aparato estava conectado a um computador controlado por software (*Graphic State*) que controlava a atividade do aparato e armazenava os dados coletados Fig. 3.



Fig. 3 – Caixa de Condicionamento Operante.

A CCO está introduzida dentro de uma caixa de isolamento com objetivo de bloquear os estímulos auditivos provenientes do ambiente externo da arena Fig. 4.



Fig. 4 – Caixa de Isolamento Acústico.

Tanto a arena quanto o dispensador de água apresentam iluminação de luz branca de baixa intensidade.

3.3.2.2. MODELAGEM

Durante todas as fases da modelagem e nos 3 protocolos experimentais, a luz ambiente permaneceu acesa e quando o cubículo central liberava água, uma outra luz também acendia no local. Primeiramente os animais foram habituados na caixa operante por 30 minutos. A água não estava presente e as luzes em cima das alavancas estavam apagadas.

A partir da fase de treinamento ao bebedouro até o fim dos experimentos os animais foram privados de água 21 horas antes dos procedimentos.

Após habituação os animais passaram por duas fases de treinamento ao bebedouro, com duração de 30 e 15 minutos, respectivamente. Nessas fases, a cada 10 segundos, a água era liberada automaticamente, independentemente do comportamento do animal.

Durante as fases seguintes, os animais foram ensinados a pressionar as barras pelo método de aproximações sucessivas. Primeiramente, os animais aprenderam a pressionar a alavanca esquerda a fim de receberem o reforço (água) imediatamente após a pressão à barra. Nessa fase as luzes localizadas acima da alavanca esquerda permaneceram acesas durante toda a sessão e as luzes localizadas em cima da alavanca direita, permaneceram apagadas. Na última fase da modelagem os animais foram ensinados a pressionar a alavanca direita. As luzes localizadas em cima da alavanca direita permaneceram acesas durante toda a sessão, enquanto que as luzes localizadas em cima da alavanca esquerda permaneceram apagadas.

Foi estabelecido um tempo máximo de 40 minutos para cada animal aprender a tarefa, caso esta não fosse aprendida nesse tempo, uma nova sessão seria necessária. Após o procedimento de modelagem, os animais adquiriram o comportamento apropriado para pressionar as alavancas. Os animais foram avaliados em 3 protocolos sucessivos de 15 sessões cada, finalizando 45 sessões. Cada sessão teve a duração 30 minutos.

3.3.2.2.1. Protocolo experimental 1

As luzes acima das alavancas acendiam randomicamente (intervalo de 100ms) permanecendo acesas por 5 segundos. A recompensa era liberada imediatamente após a pressão da alavanca correta. Caso o animal não pressionasse a alavanca correta enquanto suas luzes estivessem acesas, nada acontecia, ou seja, a água não era entregue.

3.3.2.2.2. Protocolo experimental 2

A fim de dificultar a tarefa de discriminação visual, as luzes acima das alavancas continuavam a acender randomicamente, porém com tempo reduzido para 1 segundo. A recompensa era liberada imediatamente após a pressão da alavanca correta. Caso o animal não pressionasse a alavanca correta enquanto suas luzes estivessem acesas, nada acontecia, ou seja, a água não era entregue.

3.3.2.2.3. Protocolo experimental 3

Objetivo foi verificar a presença de impulsividade e MT. As luzes acima das alavancas acendiam randomicamente, permanecendo acesas por 1 segundo, porém, quando o animal pressionava a alavanca correta a água era entregue 10 segundos depois. Caso o animal não pressionasse a alavanca correta enquanto suas luzes estivessem acesas, nada acontecia, ou seja, a água não era entregue.

3.3.3. Mensurações

O número de pressões às barras (total e a barra com as luzes acesas – alavanca correta) foi utilizado para avaliar o nível de atividade e o desempenho dos animais no decorrer das 45 sessões. O desempenho foi avaliado pelo percentual de acerto calculado pela razão entre o número de pressão à barra com luz acesa pelo número total de pressões, e o nível de atividade pelo número total de pressões à barra.

Com a finalidade de avaliar possíveis déficits na aprendizagem, foram analisadas número de sessões necessárias para aquisição da tarefa.

3.4. Análise Estatística

Os dados foram expressos como média \pm erro padrão e foram analisados empregando ANOVA mista. Utilizou-se *Bonferroni* como *post-hoc*. Valores de *p* menores ou iguais a 0,05 foram considerados significativos. A análise foi realizada utilizando o programa *Prism 5.03* para Windows.

4. RESULTADOS

4.1. Campo aberto

Na locomoção periférica, análise estatística revelou que houve diferença significativa entre os grupos ($F_{[2,30]}=5,365$ $p=0,035$), sem diferença entre as sessões ($F_{[2,30]}=0,167$ $p=0,84$) ou efeito da interação entre os fatores ($F_{[2,30]}=0,634$ $p=0,53$), (Fig. 5). A locomoção periférica foi significativamente maior no grupo experimental comparativamente ao grupo controle.

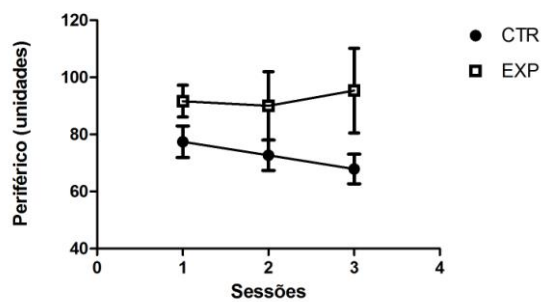


Fig. 5 – Locomoção periférica expressa como média \pm erro padrão dos grupos CTR ($n=11$) e EXP ($n=6$). A locomoção periférica foi significativamente maior no grupo EXP comparativamente ao grupo CTR.

Na locomoção central, observou-se diferença estatisticamente significativa entre grupos ($F_{[2,30]}=6,43$ $p=0,022$) e entre as sessões ($F_{[2,30]}=3,81$ $p=0,033$), sem efeito da interação entre os fatores ($F_{[2,30]}=0,20$ $p=0,81$) (Fig. 6). A locomoção central decaiu em ambos os grupos no decorrer das sessões, mas permaneceu superior ao do grupo controle.

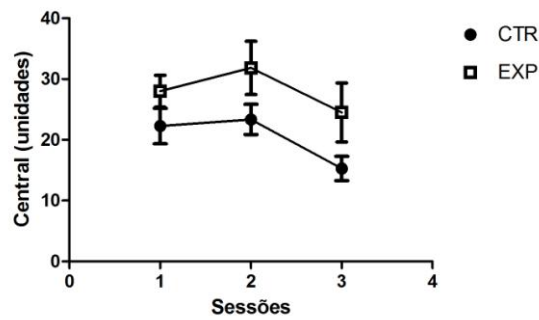


Fig. 6 – Locomoção central expressa como média \pm erro padrão dos grupos CTR (n=11) e EXP (n=6). A locomoção central foi significativamente maior no grupo EXP comparativamente ao grupo CTR.

A locomoção total, que representa a somatória da locomoção periférica com a central, foi significativamente maior no grupo experimental comparativamente ao grupo controle ($F_{[1,30]}=6,24$ $p=0,02$), sem efeito de interação entre os fatores. ($F_{[2,30]}=0,64$ $p=0,52$). A locomoção decaiu no grupo controle ao longo das sessões, e manteve-se inalterada no grupo experimental. Na terceira sessão, a locomoção total foi significativamente maior no grupo experimental em comparação com o controle ($t= 2.627$; $p < 0,05$) (Fig. 7).

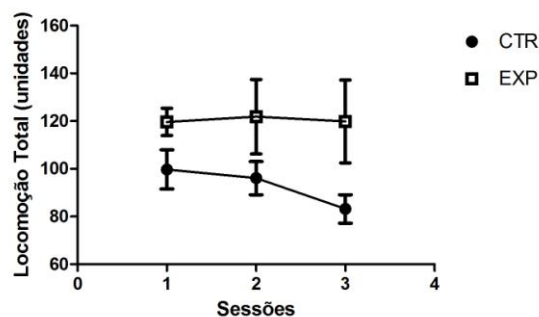


Fig. 7 – Locomoção total expressa como média \pm erro padrão dos grupos CTR (n=11) e EXP (n=6). A locomoção total foi significativamente maior no grupo EXP comparativamente ao grupo CTR.

Na exploração, não foram observadas diferenças significantes entres os grupos, sessões ou efeito da interação entre os fatores: ($F_{[1,30]}=0,17$ $p=0,68$), ($F_{[2,30]}=0,07$ $p=0,93$) e ($F_{[2,30]}=0,69$ $p=0,50$), respectivamente (Fig. 8).

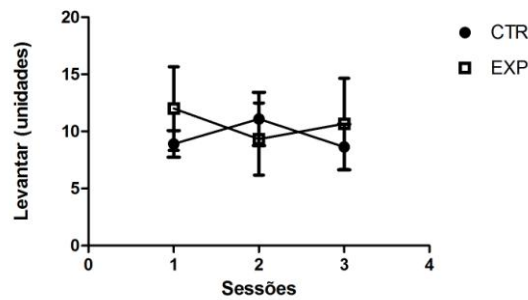


Fig. 8 – Número de Eventos de Levantar expresso como média \pm erro padrão dos grupos CTR (n=11) e EXP (n=6). O comportamento exploratório não diferiu entre os grupos.

Considerando que os animais experimentais exibiram maior atividade locomotora na área central da arena, considerada um espaço ansiogênico, analisamos o tempo de permanência nas duas regiões.

Para o tempo de permanência da zona central, a análise estatística revelou que houve diferença significativa entre os grupos ($F_{[1,30]}=6,032$ $p=0,026$), sem diferença entre as sessões ($F_{[2,30]}=2,23$ $p=0,12$) ou efeito da interação entre os fatores ($F_{[2,30]}=0,94$ $p=0,39$) (Fig. 8). O tempo na zona central foi significativamente maior no grupo experimental comparativamente ao grupo controle, sugerindo redução no estado de ansiedade (Fig. 9A).

Para o tempo na zona periférica, se observou diferença estatisticamente significativa entre grupos ($F_{[1,30]}=4,91$ $p=0,042$) sem diferença entre as sessões ($F_{[2,30]}=1,39$ $p=0,26$), ou efeito da interação entre os fatores ($F_{[2,30]}=1,67$ $p=0,2$) (Fig. 9). O tempo na zona periférica foi significante menor no grupo experimental comparativamente ao grupo controle (Fig. 9B).

A razão entre o tempo na zona central pela zona periférica foi significativamente diferente entre os grupos ($F_{[1,30]}=6,02$ $p=0,026$), sem diferença entre as sessões ($F_{[2,30]}=1,72$ $p=0,19$), e efeito da interação entre os fatores ($F_{[2,30]}=1,17$ $p=0,32$) (Fig. 9C).

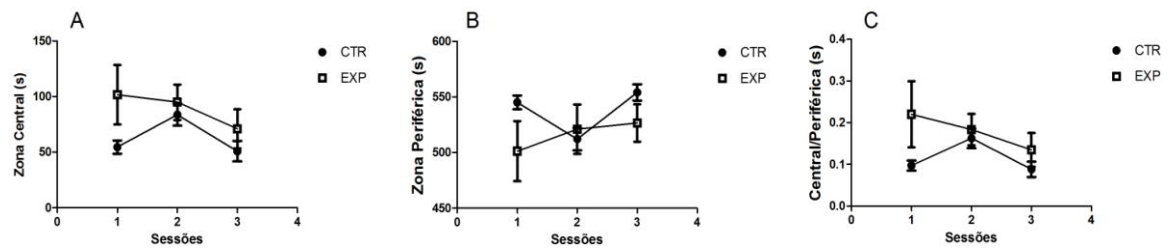


Fig. 9 – Tempo na zona central (A), tempo na zona periférica (B) e razão da zona central pela periférica (C) expressos com média \pm erro padrão dos grupos CTR (n=11) e EXP (n=6). Os animais experimentais exibiram maior tempo de permanência na zona central e menor tempo na zona periférica comparativamente aos animais controles.

Os resultados do campo aberto mostram que os animais com epilepsia apresentaram maior atividade locomotora comparativamente aos controles e que se manteve praticamente inalterada no decorrer das sessões, sugerindo déficit no comportamento de habituação. Os animais experimentais também exibiram maior tempo de permanência na zona central da arena, considerada um espaço ansiogênico, sugerindo menor grau de ansiedade em um contexto não aversivo. Para avaliar o comportamento tipo ansioso e a atividade locomotora os animais foram investigados no labirinto em cruz elevado.

4.2. LCE

Para o número total de entradas, a análise estatística revelou diferença significativa entre os grupos ($F_{[1,30]}=5,25$, $p=0,036$), sem diferença entre as sessões ($F_{[2,30]}=1,29$, $p=0,28$) ou efeito da interação entre os fatores e ($F_{[2,30]}=0,91$, $p=0,41$) (Fig. 10). A atividade locomotora foi maior no grupo experimental comparativamente ao grupo controle.

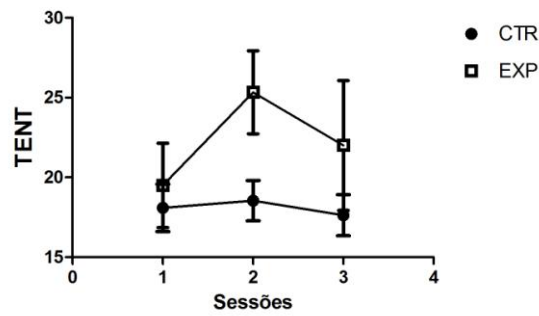


Fig. 10 – Total de entradas (TENT) expresso como média \pm erro padrão dos grupos CTR (n=11) e EXP (n=6). O grupo experimental apresentou maior atividade locomotora comparativamente ao grupo experimental.

Contudo, não foram observadas diferenças significantes entre os grupos, sessões ou interação entre os fatores para a porcentagem de entradas ($F_{[1,30]}=1,12$ $p=0,30$; $F_{[2,30]}=1,67$ $p=0,20$; $F_{[2,30]}=0,87$ $p=0,42$, respectivamente, Fig 11) e tempo nos braços abertos ($F_{[1,30]}=0,27$ $p=0,60$; $F_{[2,30]}=0,14$ $p=0,86$; $F_{[2,30]}=0,05$ $p=0,94$, respectivamente, Fig 12).

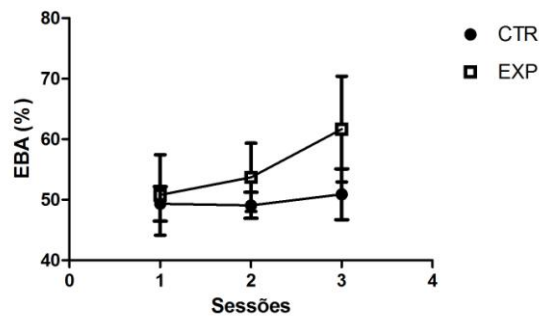


Fig. 11 – Percentagem de entradas nos braços abertos (EBA %) expresso como média \pm erro padrão dos grupos CTR (n=11) e EXP (n=6). Não foram observadas diferenças significantes entre os grupos, sessões ou interação entre os fatores.

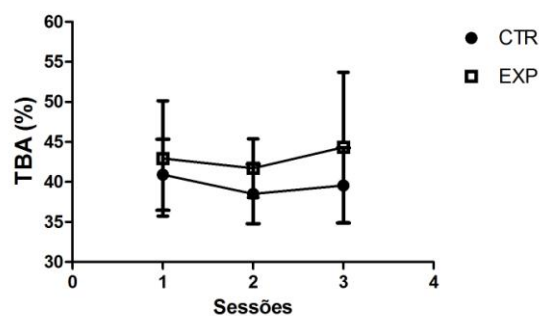


Fig. 12 – Percentagem de tempo nos braços abertos expresso como média \pm erro padrão dos grupos CTR (n=11) e EXP (n=6). Não foram observadas diferenças significantes entre os grupos, sessões ou interação entre os fatores.

A análise dos dados do LCE revela que os animais experimentais apresentaram aumento da atividade locomotora sem alteração do estado de ansiedade em contexto aversivo, embora tenha sido observada tendência para um maior tempo de permanência e entradas nos braços abertos.

4.3. Caixa de Condicionamento Operante

Os animais de ambos os grupos aprenderam a pressionar a alavanca esquerda para obtenção da recompensa na primeira sessão bem como recordaram a tarefa na sessão seguinte. Posteriormente, os animais de ambos os grupos aprenderam a pressionar a alavanca direita na primeira sessão e recordaram a tarefa na sessão posterior.

Nas sessões seguintes, as duas alavancas foram utilizadas para obtenção da recompensa. Pontos luminosos localizados acima das alavancas indicavam qual alavanca deveria ser pressionada para obtenção da recompensa. As luzes acederam aleatoriamente por períodos de tempo que variaram de acordo com o experimento (5 e 1 segundo). Cada sessão teve duração de 30 minutos.

4.3.1. Protocolo 1

Neste experimento os pontos luminosos permaneceram acesos por 5 segundos e a recompensa foi disponibilizada imediatamente após a alavanca correta ser pressionada. O objetivo do teste foi avaliar a atenção com a tarefa por meio da análise da percentagem de acerto e número de pressões à barra. Para a percentagem de acertos observou-se efeito

significante do fator sessão ($F_{[14,210]}=36,75$ $p<0,0001$), interação entre os fatores ($F_{[14,210]}=3,57$ $p<0,0001$) sem diferença entre os grupos ($F_{[1,210]}=0,379$ $p=0,54$) (Fig. 13).

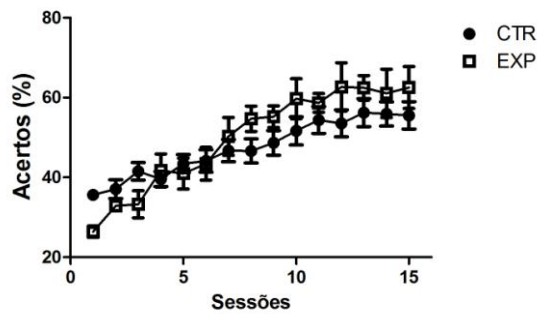


Fig. 13 – Percentagem de acertos expresso como média \pm erro padrão dos grupos CTR (n=11) e EXP (n=6). Não foram observadas diferenças significantes entre os grupos, mas sim das sessões e houve interação entre os fatores.

Resultados similares foram observados no número total de pressão à barra. A análise estatística revelou efeito significativo do fator sessão ($F_{[14,210]}=7,79$ $p<0,0001$), sem diferença entre os grupos ($F_{[1,210]}=0,49$ $p=0,49$) e sem interação entre os fatores ($F_{[14,210]}=1,63$ $p=0,07$) e (Fig. 14).

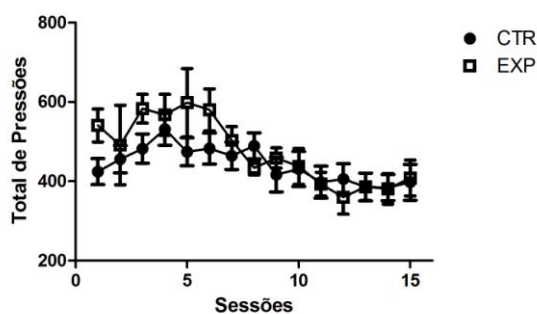


Fig. 14 – Total de Pressões às barras expresso como média \pm erro padrão dos grupos CTR (n=11) e EXP (n=6). Não foram observadas diferenças significantes entre os grupos, mas sim das sessões e sem interação entre os fatores.

A análise dos dados revelou que o desempenho dos animais experimentais foi marginalmente inferior ao do grupo controle no início das sessões. Ambos os grupos

apresentaram melhora de desempenho no decorrer das sessões; o número de pressão à barra reduziu praticamente a metade concomitantemente com o aumento da percentagem de acerto. Com este grau de dificuldade, a atenção com a tarefa foi similar entre os grupos.

4.3.2. Protocolo 2

Para aumentar o grau de dificuldade nas 15 sessões subsequentes, o tempo de exposição dos pontos luminosos foi reduzido de 5 para 1 segundo. Para a percentagem de acertos, a análise estatística mostrou um efeito significativo das sessões ($F_{[14,210]}=3,32$ $p<0,0001$), sem efeito da interação ($F_{[14,210]}=1,28$ $p=0,21$) e do grupo ($F_{[1,210]}=3,43$ $p=0,083$) (Fig. 15).

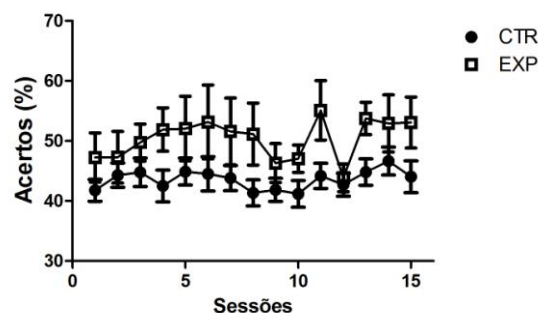


Fig. 15 – Percentagem de acerto expresso como média \pm erro padrão dos grupos CTR (n=11) e EXP (n=6). Não foram encontradas diferenças significantes entre os grupos, mas sim das sessões. Não houve interação entre os fatores.

Em relação ao número de pressão à barra, a análise estatística revelou haver diferença significativa entre as sessões ($F_{[14,210]}=4,02$ $p<0,0001$), sem diferença significativa entre os grupos ($F_{[1,210]}=0,14$ $p=0,71$) ou interação entre os fatores ($F_{[14,210]}=1,53$ $p=0,099$) (Fig. 16).

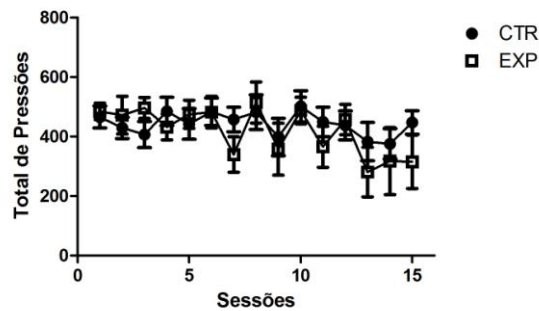


Fig. 16 – Total de Pressões às barras expresso como média \pm erro padrão dos grupos CTR ($n=11$) e EXP ($n=6$). Os grupos não diferiram estatisticamente. Houve diferença entre as sessões e efeito da interação entre os fatores.

Para melhor visualização e comparação do desempenho dos animais de ambos os grupos no decorrer das sessões, os 2 protocolos experimentais foram representados no mesmo gráfico. Com o aumento do nível de dificuldade, observa-se redução no desempenho para execução da tarefa em ambos os grupos quando comparado ao protocolo anterior. Nota-se redução na percentagem de acertos com concomitante aumento no nível de pressão à barra (Fig 17AB). Contudo, o desempenho para execução da tarefa não diferiu entre os grupos.

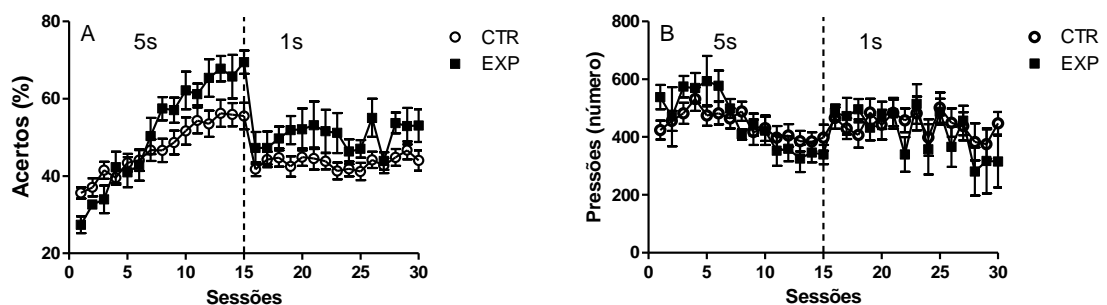


Fig 17. Porcentagem de acertos (A) e número de pressões às barras (B) expresso como média \pm erro padrão dos grupos CTR ($n=11$) e EXP ($n=6$). Com a redução do tempo de exposição dos pontos luminosos, ambos os grupos apresentaram redução na percentagem de acertos e aumento no número de pressões à barra.

4.3.3. Protocolo 3

Neste protocolo os pontos luminosos permaneceram acesos por 1 segundo, mas a recompensa, de liberação imediata, passou para 10 segundos após a barra correta ser pressionada. O objetivo foi avaliar a aversão à demora e a MT.

Para a porcentagem de acertos, a ANOVA de duas vias revelou um efeito significativo para a interação ($F_{[14,210]}=3,12$ $p=0,0002$) e sessões ($F_{[14,210]}=5,77$ $p<0,0001$), sem diferença entre os grupos ($F_{[1,210]}=4,39$ $p=0,053$), (Fig. 18). Os resultados mostram que o percentual de acerto nas sessões iniciais foi similar entre os grupos, seguido por uma melhora de desempenho no controle e uma moderada redução no grupo experimental. Na 5ª e na 12ª sessão o percentual de acerto do grupo experimental foi significativamente menor quando comparado ao controle ($t=3,29$, $p<0,05$ e $t=3,15$, $p<0,05$, respectivamente).

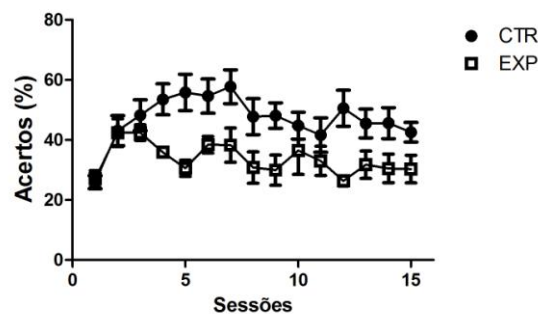


Fig. 18. Porcentagem de acertos expressos como média \pm erro padrão dos grupos CTR ($n=11$) e EXP ($n=6$). A porcentagem de acertos estabilizou em um patamar inferior no grupo experimental comparativamente ao grupo controle.

Para o total de pressões observou-se efeito significativo das sessões ($F_{[14,210]}=7,44$ $p<0,0001$) e da interação entre os fatores ($F_{[14,210]}=2,62$ $p<0,0016$), sem diferença entre os grupos ($F_{[1,210]}=0,73$ $p=0,40$) (Fig. 19). O total de pressões à barra reduziu gradualmente em ambos os grupos no decorrer das sessões, estabilizando em um patamar superior no grupo experimental.

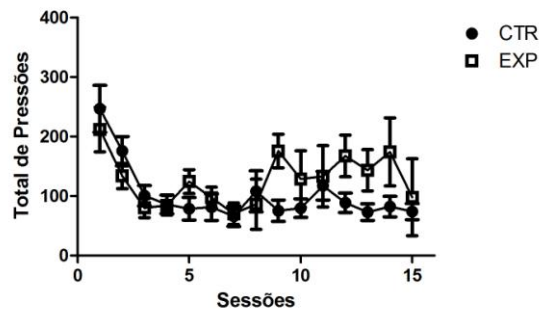


Fig. 19. Número de pressões à barra expresso como média \pm erro padrão dos grupos CTR (n=11) e EXP (n=6). O total de pressões à barra reduziu gradualmente em ambos os grupos no decorrer das sessões, estabilizando em um patamar superior no grupo experimental.

Para melhor visualização e comparação do desempenho dos animais no decorrer das sessões, os três protocolos experimentais foram representados no mesmo gráfico. Com o aumento do grau de dificuldade do teste (protocolo 3), nota-se uma redução súbita no percentual de acerto em ambos os grupos quando comparado ao protocolo anterior, seguida pela rápida recuperação do grupo controle em detrimento do grupo experimental. O percentual de acerto do grupo experimental estabilizou em um patamar inferior aquele observado no protocolo anterior e em um nível inferior ao do grupo controle, (Fig 19 A). Em relação ao número de pressões à barra, observa-se uma redução drástica em ambos os grupos quando comparado ao protocolo anterior. No grupo controle, o número de pressões à barra mantém-se reduzido com concomitante aumento do percentual de acerto, sugerindo uma melhora no desempenho. No grupo experimental, o número de pressões estabiliza em um patamar maior que a do controle enquanto o percentual de acerto tende a estabilizar em um patamar inferior (Fig 19 B).

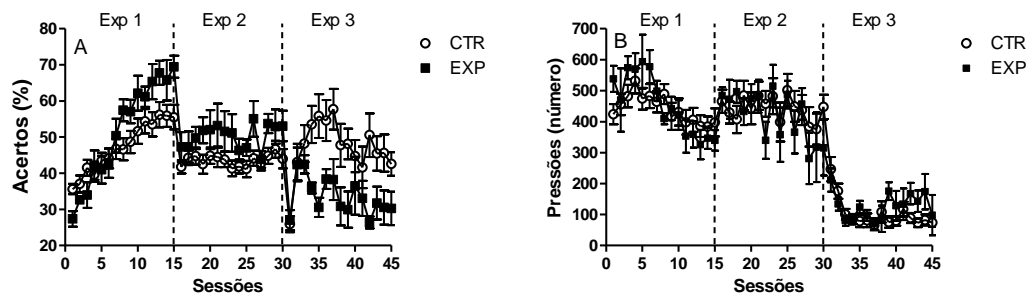


Figura 20. Percentagem de acertos (A) e número de pressões às barras (B) expressos como média \pm erro padrão dos grupos CTR (n=11) e EXP (n=6). Com a redução do tempo de exposição dos pontos luminosos, ambos os grupos apresentaram redução na percentagem de acertos e aumento no número de pressões à barra, sem diferença significativa entre os grupos. Com a introdução do retardo para liberação da recompensa (protocolo 3), a percentagem de acertos estabilizou em um patamar inferior no grupo experimental comparativamente ao grupo controle, sem alteração significativa no número de pressão à barra.

Os resultados observados na CCO sugerem que os animais com epilepsia apresentam um leve comprometimento no desempenho para tarefa de discriminação visual (protocolos 1 e 2). A partir da quarta sessão ambos os grupos apresentam desempenho semelhante, mesmo quando o tempo de exposição dos pontos luminosos reduz de 5 para 1 segundo. No protocolo com maior grau de dificuldade, com a introdução do retardo para liberação da recompensa, a diferença entre os grupos tornou-se mais evidente. O desempenho dos animais foi reduzido, reflexo do menor percentual de resposta corretas e uma tendência para um maior número de pressões à barra. O comprometimento do desempenho pode ser mais provavelmente decorrente de uma deficiência na MT, do que aversão à demora. Para a aversão a demora, seria esperado que houvesse um aumento expressivo no número de pressões à barra na tentativa de se obter a liberação imediata da recompensa. Considerando que o grau de desempenho pode estar relacionado à frequência das crises, os animais foram monitorados 24 horas/dia a partir da indução do SE.

4.4. Frequência das Crises

Os animais foram monitorados, 24 h/dia, a partir da indução do modelo até a finalização dos experimentos. A primeira crise espontânea foi registrada de 4 a 75 dias após o SE com uma frequência média por semana de $1,34 \pm 0,27$. A maioria das crises foi registrada no período diurno (67,74%).

5. Discussão

O presente trabalho investigou a presença de alterações cognitivas comportamentais nos animais com epilepsia sugestivos da presença concomitante do TDAH. Os animais com epilepsia do lobo temporal apresentam maior atividade locomotora, menor nível de ansiedade e déficit de memória de trabalho espacial, mas preservação da atenção para aprendizagem associativa em uma tarefa de discriminação visual, sem evidências de impulsividade.

Os experimentos no campo aberto e LCE foram delineados para caracterizar a presença de hiperatividade e a alteração na emocionalidade; e na caixa de condicionamento operante, a atenção, aprendizagem e memória associativa, e a impulsividade. A hiperatividade foi observada ao longo do tempo, quando os animais experimentais foram reapresentados a um ambiente com contexto neutro (campo aberto) ou quando expostos a um ambiente ameaçador (LCE). Nos controles, a atividade locomotora reduziu gradualmente no decorrer das sessões semanais. Nos experimentais, observou-se que a atividade locomotora manteve-se na zona periférica, com redução gradual na zona central. Corroborando com nossos resultados, Kubová et al., (2000) relataram maior atividade locomotora em ratos submetidos ao modelo de epilepsia pela administração do ácido caínico aos 25 dias pós-natal. A hiperatividade foi registrada durante todo o período de avaliação: 6, 13, 43 e 73 dias pós-SE. Assim, é possível especular que as alterações comportamentais têm início na fase silenciosa do modelo e que se intensificam com a reorganização sináptica ao longo do tempo, e posteriormente com a instalação das crises espontâneas e recorrentes. Esses resultados observados estão em concordância com alguns dos critérios para a validação de face de um modelo de TDAH. A hiperatividade geralmente, mas não sempre, está ausente em situações novas, e presente em ambiente familiar (SAGVOLDEN et al., 2000, SAGVOLDEN et al., 2005). Contudo, não descartamos a possibilidade dos resultados observados refletirem exatamente o oposto do pressuposto para o TDAH: prejuízo na habituação. A habituação, diminuição da resposta após exposição repetida ao mesmo estímulo, é uma forma de aprendizagem não associativa e considerada como um índice de memória. O ensaio foi validado para ser usado como paradigma da

aprendizagem e memória por Platel e Porsolt (1982) ao demonstrarem que as drogas prescritas para tratar déficit de memória induzia habituação mais rapidamente. O hipocampo e o córtex pré-frontal estão envolvidos em algumas formas de memórias não-associativas, mas a via de sinalização não é completamente conhecida. Viana et al., (2000) demonstraram que a formação da memória de habituação espacial é prejudicada após infusão pós-treino imediata de um antagonista do receptor AMPA / cainato ou agonista do receptor de GABAA na região CA1 do hipocampo dorsal. Além disso, déficit na habituação também foi observado quando o antagonista do receptor de NMDA foi infundido 15 minutos antes, mas não imediatamente após a sessão de treino. O inibidor da proteína cinase II dependente de cálcio calmodulina (CaMKII) foi amnésico quando administrado antes, imediatamente, ou mais tarde, após o treinamento. Os autores concluíram que a formação da memória de habituação espacial depende da integridade funcional dos receptores NMDA, dos receptores de AMPA / cainato e da atividade CaMKII na região CA1 do hipocampo e que a detecção da novidade espacial é acompanhada pela ativação hipocampal da cascata de sinalização da proteína cinase. Assim, prejuízo da neurotransmissão glutamatérgica pode parcialmente explicar o déficit de habituação nos animais com epilepsia. Corroborando com esta hipótese, Khan et al., (2008) relataram a diminuição no “binding” e na expressão gênica da subunidade R1 do receptor de NMDA no hipocampo de animais com epilepsia do lobo temporal. Nos tecidos resectados de pacientes com epilepsia do lobo temporal medial (ELTM) e pacientes sem ELTM, Kageyama et al., (2008) procederam com experimentos de autorradiografia e avaliaram a densidade dos receptores glutamatérgicos e benzodiazepínicos em cada área do hipocampo e do neocórtex. A densidade estava reduzida de maneira geral no grupo com ELTM. A densidade dos receptores de NMDA foi menor nas regiões CA1 e CA4, a dos receptores AMPA na região CA1 e dos benzodiazepínicos nas regiões CA1, CA3 e CA4 da formação hipocampal. Ao se comparar a redução na densidade dos três receptores no hipocampo esclerótico, se observou uma tendência da densidade dos receptores de NMDA ser maior do que a dos benzodiazepínicos em todas as áreas do hipocampo e do neocórtex. Além disso, tem sido amplamente descrito na epilepsia, condição clínica e experimental, a presença de esclerose hipocampal e déficit na memória espacial. Neste sentido, não descartamos que a maior atividade locomotora observada nos animais com epilepsia esteja associada ao prejuízo hipocampal comumente observado na ELT levando como consequência, déficit na habituação.

Em relação aos sintomas afetivos, os testes comportamentais sugeriram que os animais apresentaram redução no nível de ansiedade em contexto neutro (campo aberto) e sem alteração em contexto aversivo (LCE) comparativamente aos controles. Redução no nível de ansiedade foram relatados por Detour et al.,(2005) e Inostroza et al., (2012). No modelo do lítio-pilocarpina, Detour e colaboradores observaram no LCE maior número de entradas e tempo nos braços abertos. Utilizando o mesmo paradigma, não observamos diferença entre os grupos, mas uma tendência para maior atividade nos braços abertos. O número amostral reduzido aliado a uma maior variabilidade da resposta pode ter contribuído para a divergência de resultados entre os estudos. Inostroza et al., (2012) investigaram as sequelas emocionais em dois modelos de epilepsia que diferem significativamente no padrão e extensão das lesões cerebrais associados ao ELT: modelo do lítio-pilocarpina (LIP) e no modelo do ácido caínico (AC). Foram encontradas diferenças entre os animais tratados com AC e LIP nos testes para os comportamentos depressivos e tipo-ansioso e nos níveis de corticosterona no plasma. Ratos tratados com LIP exibiram uma maior motivação para consumir sacarina, e ambos os modelos apresentaram redução da motivação para o contato social, sendo particularmente afetados os animais tratados com LIP. O teste do campo aberto revelou redução no estado de ansiedade em ratos tratados com LIP e uma leve diminuição nos ratos tratados com AC comparativamente aos controles. Após a exposição a uma bateria de testes comportamentais, os níveis de corticosterona no plasma aumentaram somente nos animais tratados com LIP. A hiperatividade no eixo hipotálamo - hipófise - adrenal (HPA) foi correlacionada com o desempenho no teste de campo aberto e no teste de interação social. Os autores concluíram que os comportamentos emocionais alterados não são inerentes à condição epiléptica na ELT, em vez disso, provavelmente refletem à desregulação, modelo-dependente, do eixo HPA.

Os experimentos conduzidos na CCO sugerem que a atenção, aprendizagem e a memória associativa em uma tarefa de discriminação visual estão preservadas nos animais com epilepsia investigados no nosso estudo. Os mecanismos de atenção são a base para o processamento de informações durante os processos cognitivos, tais como a aprendizagem e memória (Muir, 1996). Processamento atencional aumentado comumente melhora o aprendizado, enquanto a redução na atenção retarda o aprendizado. O córtex motor primário (M1) é fundamental para a integração sensório-motora e para controle preciso dos

movimentos voluntários. Durante o aprendizado motor, a eficácia sináptica entre os córtices motor e somatossensorial é fundamental para a aprendizagem associativa que envolve a potenciação de longa duração e o receptor de glutamatérgico NMDA (HASAN et al., 2013). Neste sentido, é lícito supor que a integração sináptica entre essas regiões corticais está preservada ou pouco comprometida nestes animais. Contudo, é importante considerar que a gravidade das lesões neuropatológicas e o grau de comprometimento cognitivo e comportamental variam em grande extensão entre os laboratórios e estão não somente relacionado com SE para indução do modelo, mas também do convulsivante utilizado, cepa, idade, protocolo de indução e da gravidade e frequência das crises recorrentes (LENCK-SANTINI, 2013). Como exemplo, Inostroza et al., (2011, 2012) compararam o desempenho cognitivo e comportamental e as alterações anatômicas no modelo do LIP e do AC. De maneira geral, os resultados mostraram que o prejuízo cognitivo e comportamental foi maior no modelo LIP e fortemente correlacionado com a extensão das lesões anatômicas e com os níveis de cortisol. Algumas destas alterações já foram mencionadas anteriormente. Neste sentido, evitaremos generalizar as alterações cognitivas e comportamentais encontradas neste trabalho para a ELT. Outro aspecto importante a ser considerado, diz respeito à frequência das crises e o desempenho cognitivo e comportamental. Neste trabalho a frequência média registrada em animais continuamente monitorados por vídeo foi de 1,34 crises por semana. Utilizando o mesmo procedimento, (CAVALHEIRO et al., 1991; 1996; LEMOS; CAVALHEIRO, 1995; ARIDA et al., 1999) relataram no mesmo modelo uma frequência de crises de 2.8 crises por semana.

Considerando a epilepsia como uma doença progressiva (CASCINO, 2003) e que os danos neuropatológicos, como o do hipocampo (FUERST et al., 2003) e do neocórtex (LIU et al., 2003) estão correlacionados com a frequência de crises, é provável que os animais com baixa frequência de crises, como observado neste trabalho, tenham a aprendizagem e memória associativa preservadas. Considerando a importância do lobo temporal medial na aprendizagem e memória associativa, e em destaque o envolvimento do hipocampo (HANNULA et al, 2006; OLSON et al. 2006, HARTLEY et al, 2007; FINKE et al, 2008) é intrigante que os animais apresentem comprometimento na habituação, prejuízo na memória de trabalho viso-espacial (que será discutido posteriormente), mas mantenham preservadas a atenção, aprendizagem e a memória associativas viso-espaciais. Para

entender esta aparente discrepância, faremos algumas considerações sobre o envolvimento do lobo temporal medial na aprendizagem e na memória associativa.

O lobo temporal medial (LTM) apresenta um papel central na formação e retenção de novas memórias. O LTM não é uma área homogênea, ao invés, consiste anatomicamente de distintas sub-regiões, tais como hipocampo, córtex entorrinal, córtex perirrinal e córtex parahipocampal. Estudos neuropsicológicos, neurofisiológicos e de imagem funcional em humanos e primatas não humanos têm buscado estabelecer as diferenças funcionais entre o hipocampo e as regiões adjacentes do LTM em diversos tipos de memória (por exemplo, entre a memória episódica versus memória semântica, memória associativa versus memória não associativa; memória espacial versus memória não espacial) e entre o LTM e as regiões corticais (memória de curto prazo versus memória de longo prazo). Até o momento não há uma teoria com reconhecimento experimental unânime em humanos. Parte desta dificuldade se dá pela ausência de um modelo ideal de disfunção, considerando que em humanos os sujeitos com lesões no LTM apresentam diversas etiologias, tais como esclerose hipocampal, tumor e encefalite, e, raramente as lesões nas subregiões do LTM são bem delimitadas. Outro aspecto a ser considerado, é que existe a probabilidade de mecanismos compensatórios das áreas não lesadas produzam uma resposta final satisfatória e dificulte a compreensão do envolvimento das sub-regiões do LTM na cognição normal (BRAUN et al., 2008). Considerando esta hipótese, Braun et al., (2008) investigaram a possível reorganização do substrato neural subjacente a memória associativa em dois grupos (esclerose hipocampal e tumor cerebral benigno) com ressecção cirúrgica comparáveis do LTM direito, comparados com sujeitos controle. Os pacientes e os controles foram avaliados com a tarefa de emparelhamento com o modelo com atraso (delayed match-to-sample) que requeriam memória para cores, localização, e associação de cor-localização. Pacientes com tumor apresentaram déficit dependente do atraso na memória de associação de cor-localização. Em contraste, os pacientes com esclerose hipocampal apresentaram memória de associação preservada. Os autores levantaram a hipótese de que a reorganização sináptica/estrutural tenha contribuído para que o desempenho na tarefa estivesse preservado.

Os experimentos conduzidos na caixa de condicionamento operante, em que se utilizou um retardo para obtenção da recompensa, demonstraram que os animais com

epilepsia apresentaram redução no desempenho para execução da tarefa, evidenciado pelo menor índice de resposta corretas, sem aumento expressivo do nível de pressão à barra. Os resultados sugerem que os animais não apresentaram impulsividade ou déficit de controle inibitório, que são proeminentes no TDAH. Em contraste, Pineda et al., (2014) observaram no modelo do LIP que metade dos animais com epilepsia do lobo temporal exibiram impulsividade e atenção reduzida no teste de tempo de reação lateralizado, sugerindo a presença de TDAH e a outra metade comportamento depressivo. Aparentemente, o TDAH e o comportamento depressivo são mutuamente excludentes. Os animais incluídos no estudo apresentaram uma frequência de crises que variou de 1 a 5 por semana. Como anteriormente mencionado, os animais investigados no nosso estudo apresentaram frequência média de crises de 1,3 por semana. Os autores não estabeleceram uma correlação entre a frequência de crises e as alterações comportamentais, embora tenham observado a existência de dois padrões comportamentais dentro do grupo investigado. De fato, frequentemente os estudos conduzidos nos diferentes modelos de epilepsia falham pela falta de correlação entre a frequência de crises e as alterações, seja ela de natureza neuropatológica, molecular ou comportamental. A ausência de controle das diversas variáveis pode criar tendências para se estabelecer padrão único que pode não refletir o universo heterogêneo da ELT, quer seja na condição clínica ou experimental. Assim, destacamos a necessidade de um melhor controle das variáveis com vistas a se estabelecer diferentes padrões que equacione o modelo experimental utilizado, protocolo para indução, idade, cepa, as alterações neuropatológicas e moleculares, perfil cognitivo e comportamental, frequência das crises e a duração da epilepsia.

Como mencionado anteriormente, os experimentos conduzidos na CCO em que se utilizou um retardo para obtenção da recompensa revelaram redução no desempenho para execução da tarefa, que foi sugestivo de déficit na memória de trabalho viso-espacial. Evidências clínicas e experimentais corroboram com os nossos resultados. Deutor et al., (2005) mostraram que os animais com epilepsia do lobo temporal apresentam déficit na memória de trabalho espacial no labirinto radial. A memória de trabalho é a capacidade de manter a informação em mente momentaneamente enquanto se estiver usando as informações para executar uma ação ou durante a execução de uma ação não relacionada (BADDELEY, 1986). Classicamente, a MT tem sido considerada como dependente da

integridade do lobo frontal e independente do LTM. As evidências para a distinção do papel destes dois lobos na memória de trabalho surgiram a partir dos estudos iniciais em que se observou que a mesma não foi afetada na epilepsia do lobo temporal medial (CAVE; SQUIRE, 1992; DRACHMAN; ARBIT, 1996). No entanto, evidências posteriores revelaram que a mesma está comprometida na ELT (ABRAHAMS et al, 1999; KRAUSS et al, 1997a; OWEN et al, 1996). Evidências mais recentes baseadas em estudos de neuroimagem funcional na ELT revelam que a memória de trabalho viso-espacial está ancorada em numa rede neural bastante complexa e realçam o envolvimento do hipocampo (STRETTON et al., 2013; DOUCET et al., 2013). Stretton et al., (2013) mostraram em pacientes com ELT e déficit na memória de trabalho viso-espacial que a perda da conectividade estrutural do hipocampo esclerótico com o lobo parietal correlacionam-se com alteração da conectividade funcional (STRETTON et al., 2013). Doucet et al., 2013 observaram que pacientes com ELT direita e esquerda apresentaram uma relação negativa entre o desempenho na memória de trabalho e a conectividade funcional entre o hipocampo esquerdo e giro hipocampal. Nos pacientes com ELT direita observaram uma relação positiva entre o desempenho na MT e conectividade funcional entre o hipocampo esquerdo e o *precuneus* (parte do lobo parietal superior). Por fim, na ELT esquerda, especificamente, demonstraram uma relação negativa entre o desempenho na memória de trabalho e a conectividade funcional entre os dois hipocampos e o cerebelo ipsilateral. O trabalho mostrou evidências que a ELT direita e esquerda apresentam diferentes padrões de conectividade funcional relacionados ao prejuízo na memória de trabalho viso-espacial.

6. CONCLUSÃO

Os resultados apresentados mostram evidências que animais adultos com epilepsia do lobo temporal pelo modelo da pilocarpina apresentaram aumento da atividade locomotora e redução do nível de ansiedade, prejuízo na memória de trabalho viso-espacial, sem evidências de impulsividade. Os resultados não permitem descartar a possibilidade de déficit de atenção e apontam para a presença de hiperatividade, sintomas característicos do TDAH nos animais com epilepsia do lobo temporal. Mais estudos serão necessários para avaliar a atenção e a impulsividade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAM, S. et al. Hippocampal involvement in spatial and working memory: a structural MRI analysis of patients with unilateral mesial temporal lobe sclerosis. **Brain Cogn.** 41, 1, 39 – 65, 1999.
- ALLEGRI, R. F., DRAKE, M., THOMSON, A. Neuropsychological findings in patients with middle temporal lobe epilepsy. **Rev Neurol.** 29, 12, 1160 – 1163, 1999.
- ANDERSON, J. C. et al. DSM-III disorders in preadolescent children. Prevalence in a large sample from the general population. **Arch Gen Psychiatry.** 44, 1, 69 – 76, 1987.
- ARIDA, R. M. et al. The course of untreated seizures in the pilocarpine model of epilepsy. **Epilepsy Res.** 34, 99–107, 1999.
- BABB T.L. Synaptic reorganizations in human and rat hippocampal epilepsy. **Adv Neurol.** 79 763 – 779, 1999.
- BADDELEY, A. D. Working memory. Oxford: Oxford University Press. 1986.
- BADDELEY, A. D. Working memory. **Science**, 255, 5044, 556 – 559, 1992.
- BLACK, L. C. et al. The effect of seizures on working memory and executive functioning performance. **Epilepsy Behavior.** 17, 3, 412 – 9, 2010.
- BRAUN et al. Reorganization of associative memory in humans with long-standing hippocampal damage. **Brain.** 131, 10, 2742 – 50. 2008.
- BRUNO et al. Epilepsy and neurocysticercosis in Latin America: a systematic review and meta-analysis. **Plos Negi Trop Dis.** 7, 10, 2480. 2013.
- CASCINO, G. D., Progressive Damage in Epilepsy. **Epilepsy Curr.** 3, 6, 214 – 215. 2003.
- CASTELLANOS, F. X. Anatomic magnetic resonance imaging studies of attention-deficit/hyperactivity disorder. **Dialogues Clin Neurosci.** 4, 4, 444 – 8, 2002.
- CAVALHEIRO, E. A. et al. Long-term effects of pilocarpine in rats: structural damage of the brain triggers kindling and spontaneous recurrent seizures. **Epilepsia.** 32, 6, 778 – 82, 1991.
- CAVALHEIRO, E. A., SANTOS, N. F., PRIEL, M. R. The pilocarpine model of epilepsy in mice. **Epilepsia.** 37, 10, 1015-9. 1996.
- CAVE, C. B.; SQUIRE, L. R. Intact verbal and nonverbal short-term memory following damage to the human hippocampus. **Hippocampus.** 2, 2, 151- 63. 1992.
- CENDES F. Progressive hippocampal and extrahippocampal atrophy in drug resistant epilepsy. **Curr Opin Neurol.** 18, 2, 173 – 177, 2005.

- COHEN, R. et al. Prevalence of epilepsy and attention-deficit hyperactivity (ADHD) disorder: a population-based study. **J Child Neurol.** 28, 1, 120 – 3, 2013.
- CORCORAN R.; UPTON D. A role for the hippocampus in card sorting? **Cortex.** 29, 2, 293–304, 1993.
- COWEY, C.M., GREEN, S. The hippocampus, a working memory structure? The effect of hippocampal sclerosis on working memory. **Memory.** 4, 1, 19 – 30. 1996.
- DALBY, N. O.; MODY, M. The process of epileptogenesis: a pathophysiological approach. **Curr Opin Neurol.** 14, 2, 187 – 92, 2001.
- DETOUR J. et al. A 5-month period of epilepsy impairs spatial memory, decreases anxiety, but spares object recognition in the lithium-pilocarpine model in adult rats. **Epilepsia.** 46, 4, 499 – 508, 2005.
- DICHTER, M. A. Emerging insights into mechanisms of epilepsy: implications for new antiepileptic drug development. **Epilepsia.** 35, 4, 51 – 57, 1994.
- DOUCET G., et al. Hippocampal functional connectivity patterns during spatial working memory differ in right versus left temporal lobe epilepsy. **Brain Connect.** 3, 4, 398 – 406. 2013.
- DRACHMAN, D. A.; ARBIT, J. Memory and the hippocampal complex. II. Is memory a multiple process? **Arch Neurol.** 15, 1, 52 – 61. 1966.
- DSM-IV-TR. Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais. 4 ed. (rev). Porto Alegre: Artmed, 2002.
- DSM-V. Diagnostic and statistical manual of mental disorders. **American Psychiatric Association**, 5 ed, 2013.
- DUNCAN J.S. et al. Adult epilepsy. **Lancet.** 367, 1087–1100, 2006.
- DUNCAN, J. S. et al. Structural correlates of impaired working memory in hippocampal sclerosis. **Epilepsia.** 54, 7, 1143-53. 2013.
- DUNN, D.W. et al. ADHD and epilepsy in childhood. **Dev Med Child Neurol.** 45, 1, 50 – 4, 2003.
- DURSTON, S. et al. Activation in ventral prefrontal cortex is sensitive to genetic vulnerability for attention-deficit hyperactivity disorder. **Biol Psychiatry.** 60, 10, 1062 – 70, 2006.
- FARAONE, S. V.; BIEDERMAN J. What Is the Prevalence of Adult ADHD? Results of a Population Screen of 966 Adults. **J of Atten Disord.** 9, 2, 384 – 391, 2005.
- FINKE, C. et al. The human hippocampal formation mediates short-term memory of colour-location associations. **Neuropsychologia.** 46, 2, 614 – 23. 2008.

- FONTANA, Rda. S. et al. ADHD prevalence in four Brazilian public schools. **Arq Neuropsiquiatr.** 65,1, 134 – 7, 2007.
- FUERST D., et, al. Hippocampal Sclerosis Is a Progressive Disorder: A Longitudinal Volumetric MRI Study. **Ann Neurol.** 53, 3, 413 – 416, 2003.
- FUNG Y. K.; LAU, Y. S. Effects of prenatal nicotine exposure on rat striatal dopaminergic and nicotinic systems. **Pharmacol Biochem Behav.** 33, 1, 1 – 6, 1989.
- GAINETDINOV, R. R. et al. Role of serotonin in the paradoxical calming effect of psychostimulants on hyperactivity. **Science.** 283, 5400, 397 – 401, 1999.
- GOLDSTEIN, M.A.; Harden, C.L. Epilepsy and Anxiety. **Epilepsy Behav.** 4, 228 - 234, 2000.
- GRACE L. et al. Effect of exercise on learning and memory in a rat model of developmental stress. **Metab Brain Dis.** 24, 4, 643 – 657, 2009.
- GUEDES, F. A.; GALVIS-ALONSO, O. Y., LEITE, J. P. Neuronal plasticity associated with mesial temporal lobe epilepsy: insights form human and animal model studies. **J. epilepsy clin. neurophysiol.** 12, 1, 10 – 17, 2006.
- HANNULA, D. E. TRANEL, D. COHEN, N. J. The long and the short of it: relational memory impairments in amnesia, even at short lags. **J Neurosci.** 26, 32, 8352 – 9. 2006.
- HARTLEY, T. et al. The hippocampus is required for short-term topographical memory in humans. **Hippocampus.** 17, 1, 34 – 48. 2007.
- HASAN, M. T., et al. Role of motor cortex NMDA receptors in learning-dependent synaptic plasticity of behaving mice. **Nat Commun.** 4, 2258. 2013.
- HELMSTAEDTER, C. et al. Neuropsychological aspects of frontal lobe epilepsy. **Neuropsychologia.** 34, 5, 399 – 406, 1996.
- INOSTROZA et al. Hippocampal-dependent spatial memory in the water maze is preserved in an experimental model of temporal lobe epilepsy in rats. **Plos One.** 6, 7, e22372. 2011.
- INOSTROZA, M. et al. Different emotional disturbances in two experimental models of temporal lobe epilepsy in rats. **Plos One.** 7, 6, e38959. 2012.
- JOHNS J.M. et al. Behavioral effects of prenatal exposure to nicotine in guinea pigs. **Neurobehav Toxicol Teratol.** 4, 3, 365-369, 1982.
- KAGEYAMA et al. In Vitro Autoradiography of NMDA Receptors in the Hippocampus of Patients with Temporal Lobe Epilepsy. **Epilepsia.** 39, 5, 56 – 57. 2008.
- KELLER et al. Quantitative MRI of the prefrontal cortex and executive function in patients with temporal lobe epilepsy. **Epilepsy Behav.** 15, 2, 186-95. 2009.

- KESSLER, R. C. The prevalence and correlates of adult ADHD in the United States: Results from the National Comorbidity Survey Replication. **Am. J. Psychiatry.** 163, 4, 716 – 723. 2004.
- KHAN R., KRISHNAKUMAR, A., PAULOSE, C. S. Decreased glutamate receptor binding and NMDA R1 gene expression in hippocampus of pilocarpine-induced epileptic rats: neuroprotective role of Bacopa monnieri extract. **Epilepsy Behav.** 12, 1 54 – 60, 2008.
- KRAUSS, G. L., et al. Mesial temporal spikes interfere with working memory. **Neurology.** 49, 4, 975 – 80. 1997.
- KUBOVA, H.; et al. Effects of LiCl/pilocarpine-induced status epilepticus on rat brain mu and benzodiazepine receptor binding: regional and ontogenetic studies. **Brain Res.** 21, 1181, 104 – 17. 2007.
- KWAN, P.; SANDER, J. W. The natural history of epilepsy: an epidemiological view. **J Neurol Neurosurg Psychiatry.** 75, 10, 1376 – 81, 2004.
- LEMOES, T.; CAVALHEIRO E. A. Suppression of pilocarpine-induced status epilepticus and the late development of epilepsy in rats. **Exp Brain Res.** 102, 423-428. 1995.
- LENCK-SANTINI, P.P. Cognitive and Behavioral Comorbidities in Epilepsy: The Treacherous Nature of Animal Models. **Epilepsy Curr.** 13, 4, 182–183, 2013.
- LI, Q. et al. The usefulness of the spontaneously hypertensive rat to model attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) may be explained by the differential expression of dopamine-related genes in the brain. **Neurochem Int.** 50, 6, 848 – 57, 2007.
- LIU R.S., et, al., Progressive Neocortical Damage in Epilepsy. **Ann Neurol.** 53, 3, 312–324, 2003.
- LOUTFI, K. S.; Carvalho A. M. Possible interfaces between attention deficit hyperactivity disorder and epilepsy. **J Bras Psiquiatr.** 59, 2, 146 – 155, 2010.
- MAGIORKINIS, E.; SIDIROPOULOU, K; DIAMANTIS, A. Hallmarks in the history of epilepsy: Epilepsy in antiquity. **Epilepsy and Behavior.** 17, 1, 103 – 8, 20.
- MARIN, J. C. et al., Temporal lobe epilepsy and social behavior: an animal model for autism? **Epilepsy Behav.** 13, 1, 43 – 6, 2008.
- MCDONALD, C. R. et al. Is impairment in set-shifting specific to frontal-lobe dysfunction? Evidence from patients with frontal-lobe or temporal-lobe epilepsy. **J Int Neuropsychol Soc.** 11, 4, 477 – 81, 2005.
- MILBERGER, S. et al. Is maternal smoking during pregnancy a risk factor for attention deficit hyperactivity disorder in children? **Am J Psychiatry.** 153, 9, 1138 – 42, 1996.
- MILLICHAP, J. G. Etiologic classification of attention-deficit/hyperactivity disorder. **Pediatrics.** 121, 2, e358 – 65, 2008.

MÜLLER, C. J. et al. Differences in sensitivity to the convulsant pilocarpine in substrains and sublines of C57BL/6 mice. **Genes Brain Behav.** 8, 5, 481 – 92, 2009.

MÜLLER, C. J. et al. Pilocarpine vs. lithium-pilocarpine for induction of status epilepticus in mice: development of spontaneous seizures, behavioral alterations and neuronal damage. **Eur J Pharmacol.** 619 1 – 3, 15 – 24, 2009.

MUIR, J. L. Attention and stimulus processing in the rat. **Cognitive Brain Research.** 3, 3 – 4, 215 – 225. 1996.

MURPHY K; BARKLEY, R .A. Attention deficit hyperactivity disorder adults: comorbidities and adaptive impairments. **Compr Psychiatry.** 37, 6, 393 – 401, 1996.

National Institutes of Health: U.S. Department of Health and Human. Attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD). Publication Nº 12 – 3572, 2012.

National Institutes of Health: U.S. Department of Health and Human. Anxiety Disorder. Publication Nº 12 – 3572, 2012.

NOMURA, Y.; MARKS, D. J.; HALPERIN, J. M. Prenatal exposure to maternal and paternal smoking on attention deficit hyperactivity disorders symptoms and diagnosis in offspring. **J Nerv Ment Dis.** 198, 9, 672 – 8, 2010.

OLSON et al. Visual working memory is impaired when the medial temporal lobe is damaged. **J. Cogn. Neurosci.** 18, 7, 1087-97. 2006.

OWEN, A. M. et al. Double dissociations of memory and executive functions in working memory tasks following frontal lobe excisions, temporal lobe excisions or amygdalo-hippocampectomy in man. **Brain.** 119, 1597-615. 1996.

PARISI, P. et al. Attention deficit hyperactivity disorder in children with epilepsy. **Brain and Development.** 32, 1, 10 – 16, 2010.

PINEDA, E. et al. Behavioral impairments in rats with chronic epilepsy suggest comorbidity between epilepsy and attention deficit/hyperactivity disorder. **Epilepsy Behav.** 31, 267 – 75. 2014.

PLATEL, A.; POROLT, R. D. Habituation of exploratory activity in mice: a screening test for memory enhancing drugs. **Psychopharmacology.** 78, 4, 346-52, 1982.

PLISZKA, S. R.; MCCRAKEN, J. T.; MASS, J. W. Catecholamines in attention-deficit hyperactivity disorder: current perspectives. **J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.** 35, 3, 264 – 72, 1996.

ROHDE, L.A. et al. ADHD in a school sample of Brazilian adolescents: a study of prevalence, comorbid conditions, and impairments. **J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.** 38, 6, 716 – 22, 1999.

RUBIA, K. et al. Hypofrontality in attention deficit hyperactivity disorder during higher-order motor control: a study with functional MRI. **Am J Psychiatry.** 156, 6 891 – 6, 1999.

- RUBIO, C. et al. In vivo experimental models of epilepsy. **Cent Nerv Syst Agents Med Chem.** 10, 4, 298 – 309, 2010.
- RUSSELL, V. A. The nucleus accumbens motor-limbic interface of the spontaneously hypertensive rat as studied in vitro by the superfusion slice technique. **Neurosci Biobehav Rev.** 24, 1, 133 – 6, 2000.
- RUSSELL, V. et al. Altered dopaminergic function in the prefrontal cortex, nucleus accumbens and caudate-putamen of an animal model of attention-deficit hyperactivity disorder--the spontaneously hypertensive rat. **Brain Res.** 676, 2, 343 – 51, 1995.
- SAGVOLDEN T. et al. The spontaneously hypertensive rat model of ADHD: the importance of selecting the appropriate reference strain. **Neuropharmacology.** 57, 7 – 8, 619 – 26, 2009.
- SAGVOLDEN, T. Behavioral validation of the spontaneously hypertensive rat (SHR) as an animal model of attention-deficit/hyperactivity disorder (AD/HD). **Neurosci. Biobehav. Rev.** 24, 1, 31 – 9. 2000.
- SAGVOLDEN, T. et al. The spontaneously hypertensive rat (SHR) as an animal model of childhood hyperactivity (ADHD): changed reactivity to reinforcers and to psychomotor stimulants. **Behav Neural Biol.** 58, 2, 103 – 12, 1992.
- SANDER, J. W. Some aspects of prognosis in the epilepsies: a review. **Epilepsia.** 34, 6 1007 – 16, 1993.
- SCORZA, F. A. The pilocarpine model of epilepsy: what have we learned? **An Acad Bras Cienc.** 81, 3, 345 – 65, 2009.
- SOLANTO, M. V. Neuropsychopharmacological mechanisms of stimulant drug action in attention-deficit hyperactivity disorder: a review and integration. **Behav Brain Res.** 94, 1, 127 – 52, 1998.
- SONTAG, T. A. et al. Animal models of attention deficit/hyperactivity disorder (ADHD): a critical review. **Atten Defic Hyperact Disord.** 2, 1, 1 - 20, 2010.
- STELLA, F. and MACIEL, J. A. Attentional disorders in patients with complex partial epilepsy. **Arq Neuropsiquiatr.** 61, 2B 335 – 8, 2003.
- STRETTON, J. et al. Disrupted segregation of working memory networks in temporal lobe epilepsy. **Neuroimage Clin.** 2, 273 – 81, 2013.
- STRETTON, J.; THOMPSON, P. J. Frontal lobe function in temporal lobe epilepsy. **Epilepsy Res.** 98, 1, 1 – 13, 2012.
- SWANSON, J. M.; HECHTMAN, L. Using long-acting stimulants: does it change ADHD treatment outcome? **Can Child Adolesc Psychiatr Rev.** 14, 1, 2 – 3, 2004.
- SZATMARI, P; OFFORD, D. R. BOYLE, M. H. Ontario Child Health Study: prevalence of attention deficit disorder with hyperactivity. **J Child Psychol Psychiatry.** 30, 2, 219 – 30, 1989.

- TAKAYA, S. Prefrontal hypofunction in patients with intractable mesial temporal lobe epilepsy. **Neurology**. 67, 9, 1674 – 6, 2006.
- TAN, M. e APLETON, R. Attention deficit and hyperactivity disorder, methylphenidate, and epilepsy. **Arch Dis Child**. 90, 1, 57 – 9, 2005.
- TÉLLEZ-ZENTENO, J. F. e HERNANDÉZ-RONQUILLO, L. A review of the epidemiology of temporal lobe epilepsy. **Epilepsy Res. And Treat**. 2012.
- THOMPSON P. J.; DUNCAN, J. S. Cognitive decline in severe intractable epilepsy. **Epilepsia**. 46, 11, 1780 – 7, 2005.
- TRIMBLE, M.R.; SCHMITZ, B. The psychoses of epilepsy: a neurobiological perspective. In: McConnell HW, Snyder PJ. **Psychiatric Comorbidity in Epilepsy**. 43, 8, 169 – 186, 1998.
- TURSKI, W. A. et al. Seizures produced by pilocarpine in mice: a behavioral, electroencephalographic and morphological analysis. **Brain Res**. 321, 2, 237 – 53, 1984.
- TURSKI, W.A et al. Cholinomimetics produce seizures and brain damage in rats. **Experientia**. 39, 12, 1408 – 11, 1983.
- VAIDYA, C. J. et al. Selective effects of methylphenidate in attention deficit hyperactivity disorder: a functional magnetic resonance study. **Proc Nati Acad Sci U S A**. 95, 24, 14494 – 9. 1998.
- VALERA, E. M. et al. Meta-analysis of structural imaging findings in attention-deficit/hyperactivity disorder. **Biol Psychiatry**. 61, 12 1361 – 9, 2007.
- VIANNA, M. R. M. et al. Role of Hippocampal Signaling Pathways in Long-Term Memory Formation of a Nonassociative Learning Task in the Rat. **Learning and Memory**. 7, 5, 333 – 340. 2000.
- VLOOSWIJK M.C., et al. Memory processes and prefrontal network dysfunction in cryptogenic epilepsy. **Epilepsia**. 52, 8, 1467–1475, 2011.
- VOELLER, K. K. Attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD). **J Child Neurol**. 19, 10, 798 – 814, 2004.
- WENIGER, G.; BOUCSEIN, K.; IRLE, E. Impaired associative memory in temporal lobe epilepsy subjects after lesions of hippocampus, parahippocampal gyrus, and amygdala. **Hippocampus**. 14, 6, 785 – 96, 2004.
- WILNNER, P. Animal models as simulations of depression. **Trends Pharmacol Sci**. 12, 4 131-6. 1991.
- ZAMARIAN, L. et al. Executive functions in chronic mesial temporal lobe epilepsy. **Epilepsy Res Treat**. 2011.



UNIVERSIDADE PRESBITERIANA MACKENZIE
DECANATO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Coordenadoria de Pesquisa - Comitê de Ética no Uso de Animais



São Paulo, 19 de outubro de 2012.

À Senhora

Prof^a. Dr^a. Roberta Monterazzo Cysneiros

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde

Após a análise do projeto de pesquisa "**Alterações das funções executivas e de receptores catecolaminérgicos em animais expostos ao status epilepticus**" processo CEUA/UPM Nº 093/08/2012, o Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Presbiteriana Mackenzie **aprova** os procedimentos éticos do referido projeto.

Solicitamos, por gentileza, que após a conclusão do citado projeto seja encaminhada uma cópia digital, do Relatório Final, para finalizarmos o seu processo neste Comitê.

Solicitamos, também, que a Orientadora do projeto seja portadora deste documento e encaminhe uma cópia à sua orientanda.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Elizeu Coutinho de Macedo

Presidente do Comitê de Ética no Uso de Animais

Projeto analisado na Reunião Mensal de setembro.